



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>G01N 27/30, 27/416</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/57157</b> (43) Date de publication internationale: 17 décembre 1998 (17.12.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01213			(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Date de dépôt international: 11 juin 1998 (11.06.98)			
(30) Données relatives à la priorité: 97/07530 11 juin 1997 (11.06.97)	FR		<b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): ECOLE CENTRALE DE LYON [FR/FR]; 26, avenue Guy de Collongue, Boîte postale 163, F-69131 Ecully Cedex (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CN [FR/FR]; RS ), 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MARTIN, Jean-René [FR/FR]; 66, rue Bellevue, F-69380 Lozanne (FR). SOUTEYRAND, Eliane [FR/FR]; 18, chemin du Moulin-Carron, F-69130 Ecully (FR).			
(74) Mandataire: ROPITAL-BONVARLET, Claude; Cabinet Beau de Loménie, 51, avenue Jean Jaurès, Boîte postale 7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).			

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING AND/OR ANALYSING BIOLOGICAL SUBSTANCES, PRESENT IN A CONDUCTIVE LIQUID, DEVICE AND AFFINITY SENSOR USED FOR IMPLEMENTING SAID METHOD

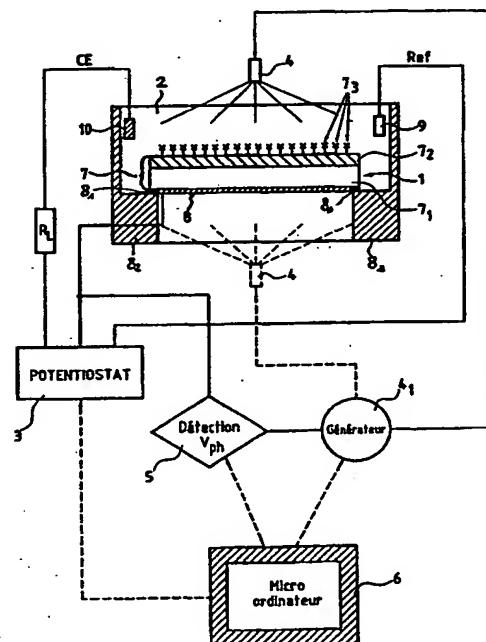
(54) Titre: PROCEDE D'IDENTIFICATION ET/OU DE DOSAGE DE SUBSTANCES BIOLOGIQUES, PRESENTES DANS UN LIQUIDE CONDUCTEUR, DISPOSITIF ET CAPTEUR D'AFFINITE UTILES POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE

(57) Abstract

The invention concerns an improved method for identifying and/or analysing polynucleotides PN present in a conductive liquid medium, using an affinity sensor comprising a multilayer structure *semiconductor/insulant/probe = polynucleotides PNC complementary to the medium PN*. The method consists in selecting non-marked PNC; polarising the semiconductor, periodically lighting it; measuring the flat band potential variations induced by loading effect phenomenon directly and essentially related to specific pairings between PN and PNC; and finally interpreting the signals collected at the end of the identification and/or analysis of PN. The invention also concerns the device and the sensor used for implementing the method. It is applicable to molecular biology analysis, e.g. diagnosis of viral or genetic diseases.

(57) Abrégé

L'invention a pour but de fournir un procédé perfectionné d'identification et/ou de dosage de polynucléotides PN présents dans un milieu liquide conducteur. Ce procédé consiste à faire intervenir un capteur d'affinité comprenant une structure multicouches *semi-conducteur/isolant/sondes = polynucléotides PNC complémentaires aux PN du milieu*. Selon ce procédé, on sélectionne des sondes PNC non marquées, on polarise le semi-conducteur, on l'éclaire périodiquement, on mesure les variations du potentiel de bande plate induites par un phénomène d'effet de charge directement et essentiellement lié aux appariements spécifiques entre PN et PNC, et enfin on interprète les signaux recueillis en terme d'identification et/ou de dosage des PN. L'invention concerne également le dispositif et le capteur utile pour la mise en oeuvre de ce procédé. Application: analyse en biologie moléculaire, e.g. diagnostic de maladies virales ou génétiques.



**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**PROCEDE D'IDENTIFICATION ET/OU DE DOSAGE DE SUBSTANCES BIOLOGIQUES, PRESENTES DANS UN LIQUIDE CONDUCTEUR, DISPOSITIF ET CAPTEUR D'AFFINITE UTILES POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE**

5

**DOMAINE TECHNIQUE :**

Le domaine de l'invention est celui de la détection de produits, de préférence biologiques («affins»), tels que les acides nucléiques, ou bien encore les 10 biopolymères de nature protéique.

Plus précisément, la présente invention concerne, d'une part, un procédé d'analyse qualitative et/ou quantitative de substances biologiques SBC, de préférence des polynucléotides PN présentes dans un milieu liquide (solution ou gel) conducteur LC, par l'intermédiaire de mesures optoélectrochimiques et, d'autre part, les 15 dispositifs et les capteurs d'affinité destinés à la mise en oeuvre de ce procédé.

Les substances biologiques, plus particulièrement mais non limitativement, visées par l'invention sont les polynucléotides PN. Sous ce terme général, on englobe conformément à l'invention, les molécules composées d'au moins deux nucléotides (oligonucléotides et polynucléotides stricto sensu), dont notamment les acides 20 nucléiques ARN ou ADN et toute structure génétique en comprenant. L'invention concerne également les composés susceptibles d'être impliqués dans des réactions de couplage immunologique [Antigène Ag/anticorps Ac], voire de reconnaissance Enzyme/Substitut E/S.

25

**ART ANTERIEUR :**

Pour détecter, identifier ou doser ces molécules, on a exploité leurs propriétés de bioaffinité, à savoir leur aptitude singulière à s'apparier spécifiquement avec leurs complémentaires, selon des mécanismes d'hybridation génétique PN/PNc, 30 (PN<sub>c</sub> = PolyNucléotide complémentaire) de couplage immunologique Ag/Ac ou de reconnaissance E/S.

C'est ainsi que, dans le domaine immunologique, on connaît des méthodes qui sont fondées sur le couplage antigène/anticorps et qui font intervenir une étape de révélation des couples formés à l'aide de marqueurs radioactifs, enzymatiques, 35 fluorescents, colorés ou analogues. De telles méthodes sont longues et complexes à

mettre en oeuvre. De plus, les réactifs utilisés sont peu disponibles et onéreux. Enfin, ces méthodes ne permettent pas des mesures en continu et encore moins *in vivo*.

Ces techniques ont été transposées avec leurs défauts au domaine de la détection de séquences nucléiques, qui doivent ainsi nécessairement être marquées pour pouvoir être dosées et/ou identifiées.

Dans un autre registre, il a été proposé de s'attacher à la détection des signaux physiques de toute nature, susceptibles d'être induits par les réactions biochimiques d'hybridation nucléotidique ou couplage immunologique. Pour ce faire, il convient, tout d'abord, d'isoler un type de signaux particuliers et caractéristiques, puis d'adopter un transducteur apte à convertir lesdits signaux en une grandeur physique mesurable. Ces signaux peuvent être, par exemple, la production d'une espèce chimique, une variation d'épaisseur, d'indice optique, de masse ou bien encore une variation de propriétés électriques. Les transducteurs peuvent donc être des capteurs électrochimiques, piézoélectriques, optiques ou électriques. Toute la difficulté réside dans la mise en évidence des signaux spécifiques de l'appariement et dans la mise au point d'un transducteur correspondant fiable, sensible et fidèle.

L'invention décrite dans la demande de brevet français n° 94 08688 s'insère parfaitement dans cet état de la technique fondé sur la détection des signaux électriques, induits par des hybridations PN/PNc ou par des réactions antigène-anticorps, dans un milieu liquide conducteur de l'électricité.

Cette demande de brevet décrit un procédé d'analyse qualitative et/ou quantitative de substances biologiques, en particulier, des polynucléotides, des antigènes, des anticorps, des enzymes, des substrats, dans lequel on met en oeuvre une structure multicouches comprenant une plaquette de semi-conducteur recouverte d'un isolant dont la surface est fonctionnalisée par l'une des espèces des paires de substances biologiques sus-visées, appariables spécifiquement. Selon ce procédé, on polarise le semi-conducteur contenant des polynucléotides PN à doser ou à identifier, on recueille les variations des signaux électriques induites par un phénomène d'effet de charge directement et essentiellement lié aux appariements des substances biologiques visées avec leurs ligands complémentaires fixés sur l'isolant, éventuellement par l'intermédiaire d'une membrane sensible.

Cette technique de mesure par transduction électrique ne nécessite pas d'intermédiaire de réaction, pas plus que de marqueur spécifique ni de réaction enzymatique. Elle donne satisfaction mais reste néanmoins perfectible en ce qui concerne la simplicité de mise en oeuvre et l'accès à une possibilité de réalisation de séries de mesures rapides

de différents substrats, sans utiliser autant de capteurs qu'il existe de natures différentes de substrats à analyser.

Selon cette technique, le phénomène d'effet de charges peut être appréhendé par mesure d'impédance électrochimique d'une structure *semi-conducteur/isolant/membrane sensible/liquide conducteur*. Selon une variante, la caractérisation de l'effet de champ dû à la variation de la charge superficielle induite par l'appariement, peut être réalisée à l'aide d'un transistor à effet de champ polarisé et sur lequel on mesure les variations du potentiel grille/source induit par l'effet de champ.

Il existe par ailleurs, des propositions techniques d'identification et/ou de dosage de molécules biologiques, qui combinent

- d'une part, des moyens de révélation des substances à doser faisant appel à des marqueurs radioactifs, enzymatiques, fluorescents, colorés, modificateurs de potentiel redox ou de pH, ou analogues,
- et d'autre part, des moyens de transduction électrochimiques ou optoélectrochimiques.

Malheureusement, une telle combinaison n'est pas de nature à supprimer les inconvénients liés aux techniques basées sur la révélation, ni à améliorer les techniques d'analyse électrochimique.

C'est ainsi que les brevets américains N° 4 591 550 et 5 500 188 divulguent un procédé et un dispositif pour la détermination et le dosage d'une ou plusieurs substances contenues dans un milieu liquide gazeux ou solide et capables de modifier les caractéristiques de photoréponse d'un élément photosensible, comprenant des moyens de reconnaissance desdites substances. Ces derniers impliquent un mécanisme de révélation par un ou plusieurs produits traceurs susceptibles de modifier les caractéristiques physicochimiques du milieu d'analyse (pH, potentiel redox) et/ou susceptibles d'être mis en évidence par un marqueur radioactif coloré ou fluorescent.

Il s'agit donc d'une technique hybride associant des moyens de transduction optoélectrochimique et des moyens de révélation physicochimiques.

Le dispositif mis en oeuvre dans ce procédé connu comprend un ou plusieurs capteurs constitués chacun par une plaquette de semi-conducteur (silicium recouvert d'une couche d'isolant  $\text{SiO}_2$  ou nitrure de silicium), la surface de cette dernière étant éventuellement fonctionnalisée par des moyens de reconnaissance des substances à doser et/ou à identifier. Ce dispositif est également pourvu de moyens de polarisation de la structure semi-conducteur/isolant (e.g. circuit d'application d'une tension de polarisation, ledit circuit comprenant d'une part, une contre-électrode et une électrode de référence et étant relié, d'autre part, à la structure semi-conducteur/isolant). Le

dispositif comporte, en outre, des moyens d'irradiation du ou des éléments photosensibles ainsi que des moyens de mesure de signaux électriques résultants, de détection et/ou d'identification des substances considérées.

Il est à noter que chaque élément photosensible comprenant la structure semi-conducteur/isolant est nécessairement associé à des moyens d'éclairage, des moyens de polarisation et des moyens de mesure. Il s'ensuit une extrême complexité du dispositif dans ses variantes visant la multidétection de substances différentes, à la fois sur le plan de la structure en tant que telle et sur le plan de la prise en charge et du traitement des mesures et des signaux résultants.

10 La couche d'isolant des éléments photosensibles selon cet art antérieur, est fonctionnalisée dans le cas où les substances à analyser sont des systèmes affins PN/PNC, E/S, Ag/Ac. Dans ce cas, les ligands de reconnaissance fonctionnalisant la couche d'isolant sont systématiquement marqués. Cela est illustré notamment pour l'analyse d'ADN ou ARN, dans laquelle les ligands complémentaires de reconnaissance sont marqués avec le biotine (Cf. colonne 14 lignes 49 à 63 de l'US-A-5 500 188). Dans de telles configurations, on doit donc supporter tous les inconvénients liés à ces techniques de révélation par marqueur. Il convient d'ailleurs d'observer que celles qui font intervenir l'absorption ou l'émission de radiations lumineuses, risquent de surcroît de perturber l'irradiation d'activation prévue selon ce procédé.

20 Dans l'hypothèse où il ne s'agit pas de systèmes affins sous-tendant une fonctionnalisation spécifique de l'isolant des capteurs, les moyens traceurs sont e.g. des variations de pH ou de potentiel Redox. Il doit être considéré que ces moyens ne sont pas des plus fiables car il existe bon nombre de facteurs dans le milieu d'analyse, 25 qui est par exemple un liquide conducteur, susceptibles d'interférer sur ces paramètres, sans que cela ne soit lié au dosage et à l'identification des substances visées.

De plus, bien qu'il n'exclut pas le fait que le signal mesuré au sortir de leur capteur puisse être le photopotentiel, la photoconductance, la photocapacitance ou la photoinductance, ou des combinaisons de celles-ci (colonne 3, lignes 36 et 37-US-A-5 500 188), il est précisé lignes 41 à 43 colonne 3 de ce même brevet que le signal mesuré est la résultante d'un changement d'un courant continu d'un courant alternatif ou de l'effet d'un courant continu sur un courant alternatif. Cette préférence quant à la prise en compte du photocourant comme signal résultant, ressort également de manière claire et exclusive des exemples de ces brevets US, dans lesquels on prend en compte soit le courant nécessaire pour maintenir un potentiel constant entre l'élément

sensible et la référence (colonne 19 lignes 4 à 7), soit les variations de ce courant, qui correspondent aux changements de l'environnement chimique au voisinage de l'isolant de l'élément sensible (colonne 19 lignes 43 à 45) soit le potentiel requis pour maintenir un courant constant (colonne 19 lignes 62 à 65), soit la variation du courant d'alimentation des moyens d'irradiation nécessaires pour maintenir un potentiel constant entre la structure de mesure et la référence (colonne 20 lignes 42 à 49). Cela ressort également des passages colonne 26 lignes 7 à 9 et lignes 30 à 34.

Il apparaît donc que le signal central pris en considération dans le procédé et le dispositif selon les brevets US-A-4 591 550 et 5 500 188, est le photocourant mesuré de manière directe ou indirecte. Or, la relation entre l'éclairement et ce photocourant est mal définie et englobe plusieurs phénomènes physiques. Il en résulte donc une incertitude sur l'interprétation des mesures.

Force est donc de constater, que cette proposition technique hybride évoquée ci-dessus, ne donne nullement satisfaction en matière d'analyse qualitative et/ou quantitative de substances, en particulier biologiques, et plus particulièrement encore polynucléotidiques. Les Demandeurs en veulent d'ailleurs pour preuve qu'il n'existe à ce jour sur le marché aucune application industrielle et commerciale de l'invention décrite dans ces brevets US N° 4 591 550 et 5 500 188.

## 20 BREF EXPOSE DE L'INVENTION :

Aussi, pour poser la problématique à la base de la présente invention, les inventeurs se sont fixés notamment comme objectif essentiel de fournir un procédé d'identification et de dosage de substances biologiques, de préférence de 25 polynucléotides, ce procédé devant intégrer *notamment* les spécifications suivantes :

- spécificité,
- haute sensibilité,
- commodité de mise en oeuvre,
- «applicabilité» à une grande variété de substances biologiques, et 30 notamment aux substances polynucléotidiques,
- faible coût de revient,
- miniaturisation possible de façon à permettre des mesures analytiques, *in situ* et/ou *in vivo*, de façon continue ou discontinue ;
- grande fiabilité
- bonne reproductibilité

- accès à la multidétection, c'est-à-dire l'identification et/ou le dosage de substances différentes (polynucléotides hétéroclites) contenues dans un seul et même milieu d'analyse,
- application au diagnostic de maladies virales, génétiques, dès lors qu'il s'agit de multidétection simple à mettre en oeuvre à interpréter vis-à-vis de polynucléotides.

5 Pour satisfaire à ces objectifs, parmi d'autres, les inventeurs ont eu le mérite de mettre en évidence, de façon tout à fait surprenante et inattendue, que les appariements spécifiques entre des molécules de préférence biologiques et plus préférentiellement 10 encore entre des brins polynucléotidiques complémentaires, induisent une modification de la charge électrique superficielle dans une structure multicouches, semi-conducteur Sc/isolant Is fonctionnalisé superficiellement. Cette modification intervient plus précisément à l'interface avec un milieu liquide conducteur LC, ledit effet de charge constituant le signal de base d'identification et de dosage, perçu de 15 manière directe ou indirecte par des moyens de transduction optoélectrochimiques.

La mise en pratique de ce concept original et avantageux s'est exprimé au travers de la présente invention, qui a donc pour objet un procédé d'identification et/ou de dosage de Substances Biologiques - de préférence électriquement Chargées - (SBC), présentes dans un milieu Liquide Conducteur LC, à l'aide d'au moins un 20 capteur d'affinité comprenant au moins une structure comportant au moins un matériau semi-conducteur Sc, revêtu sur au moins l'une de ses faces d'au moins une couche d'isolant Is, cette dernière présentant à sa surface au moins une sonde So, en contact avec le milieu conducteur LC et comprenant une ou plusieurs Substances Biologiques de Reconnaissance spécifique (SBR) par interaction affine, des SBC du 25 milieu LC sus-visé,

caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à :

- a - sélectionner à titre de sonde(s) So, des SBR non-marquées,
- b - faire en sorte que le niveau de Fermi du Sc corresponde sensiblement au, ou passe par le niveau intrinsèque en surface du Sc,
- c - soumettre le Sc à un éclairement périodique comprenant des photons dont l'énergie est  $\geq$  à l'énergie de la bande interdite du Sc,
- d - mesurer directement ou indirectement les variations  $\Delta V_{bp}$  du potentiel de bandes plates Vbp du Sc, induites par un phénomène d'effet de charges directement et essentiellement lié aux

appariements spécifiques des **SBC** du milieu conducteur **LC** avec leurs ligands complémentaires **SBR** de la ou des sondes **So**, à l'exclusion :

5 (i) des variations résultant d'éventuels effets de charges et/ou de transferts de charges provoqués par des réactions chimiques catalysées par des enzymes et dans lesquelles se produit une consommation d'une partie des substances à détecter,

10 (ii) et des variations de la photoréponse liées à l'apparition dans le milieu **LC** d'au moins un produit traceur susceptible d'être révélé au travers de variations de pH ou de potentiel Redox, et/ou au travers de marqueurs, de préférence du type de ceux absorbant ou émettant des radiations (fluorescents, radioactifs, colorés, e.g.).

15 - e - et interpréter les signaux recueillis en termes d'identification et/ou de dosage des **SBC** du **LC**.

Un tel mode de mesure par transduction optoélectrochimique répond aux spécifications recherchées de simplicité, sensibilité, spécificité, fiabilité et reproductibilité.

20 Par ailleurs, la technique selon l'invention présente également l'avantage d'être réversible. En effet, on peut aisément réaliser le désappariement des espèces complémentaires ayant réagi spécifiquement au niveau de la membrane sensible de la structure semi-conductrice. La membrane sensible peut être ainsi régénérée après chaque utilisation et ce à de multiples reprises.

25 De tels résultats avantageux étaient, a priori, difficilement prévisibles.

En particulier, cette technique s'est révélée être d'une efficacité remarquable dans le cadre de la reconnaissance de séquences polynucléotidiques par hybridation des monobrins d'acides nucléiques (ligands), qui forment ces séquences, avec des monobrins polynucléotidiques complémentaires, immobilisés sur la couche d'isolant de la structure **Sc/Is**. Ainsi, selon un mode préféré de mise en oeuvre du 30 procédé selon l'invention les **SBC** sont des polynucléotides **PN** et les **SBR** sont des polynucléotides **PNc**.

La présente invention permet d'envisager, notamment, la reconnaissance de séquences nucléotidiques, par exemple en vue de la détection de maladies génétiques, de la détection et la caractérisation de virus, de bactéries et de parasites ou pour 35 l'établissement de cartes génétiques, l'étude de l'expression et/ou de la mutation des gènes.

Outre, l'hybridation nucléotidique, il est envisageable d'exploiter d'autres appariements spécifiques que sont par exemple, les mécanismes biochimiques de couplage immunologique, voire de complexation enzyme/substrat, pour peu que l'appariement entraîne une variation de charges électriques à la surface de Is.

5

### EXPOSE DETAILLE DE L'INVENTION :

Le principe d'analyse qui gouverne le procédé selon l'invention est exclusivement optoélectrique ou optoélectrochimique. Cela signifie que l'on a à faire à une reconnaissance biochimique affine, c'est-à-dire qui ne fait pas intervenir de réactions chimiques ou enzymatiques et qui se déroule sans production ou consommation d'espèces chimiques intermédiaires. En outre, la révélation de cette reconnaissance biochimique affine ne se fait pas au travers d'une détection indirecte à l'aide de moyens physicochimiques de révélation : traceurs colorés, fluorescents, radioactifs, potentiels redox, pH. Conformément à l'invention, la reconnaissance biochimique s'opère essentiellement, voire exclusivement par une transduction optoélectronique soustendant la polarisation de la structure Sc/Is par rapport à LC, ainsi que l'éclairement périodique de ladite structure.

Au sens de l'invention, l'expression « électriquement chargées » signifie que lors de l'interaction affine de la PN<sub>c</sub> avec la PN, la charge électrique de surface est modifiée.

La première étape - a - du procédé selon l'invention consiste à mettre exclusivement en oeuvre des sondes So, en particulier des PNc, non marqués, c'est-à-dire non porteurs de moyens de révélation physicochimiques (fluorescence, colorimétrie, radioactivité, potentiel redox, pH).

Dans le cas d'une structure fonctionnalisée en surface par des sondes constituées par des monobrins polynucléotidiques PNc par exemple d'ADN, l'hybridation de ces derniers avec les brins à doser ou à identifier dans le milieu LC entraîne un accroissement de charges sur la surface de la structure. Ceci conduit à une modification de la répartition des porteurs de charge dans la zone de charge d'espace du semi-conducteur, afin de satisfaire au nouvel équilibre thermodynamique de la structure. Cette nouvelle répartition se traduit par une modification de la courbure des bandes du semi-conducteur dans sa zone interfaciale en contact avec le diélectrique. Le potentiel de bandes plates Vbp est le potentiel qu'il faut appliquer au semi-conducteur par rapport au milieu LC (électrolyte) en contact avec le diélectrique Is pour obtenir une courbure nulle des bandes du Sc. Conformément à l'invention, on

mesure cette grandeur physique  $V_{bp}$  ou sa variation  $\Delta V_{bp}$ , de manière à caractériser l'état d'équilibre de la structure. Ainsi, la modification de la charge de surface correspond à une variation de  $V_{bp}$ , qui est elle-même une signature de l'hybridation **PN/PNc**.

5 Pour qu'il y ait variation de la courbure de bandes du **Sc** et donc de  $V_{bp}$ , il convient conformément à l'étape **b** du procédé selon l'invention, de créer une courbure de bande initiale du **Sc**, en procédant à l'ajustement des niveaux de fermi du **Sc** et du milieu **LC**, de préférence par l'imposition d'une tension de polarisation  $V_p$  continue à la structure **Sc/Is - PNc**, par rapport au milieu **LC**.

10 Conformément à un premier mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, l'ajustement du niveau de Fermi du semi-conducteur **Sc** sensiblement à son niveau intrinsèque en surface, s'opère en imposant une tension de polarisation  $V_p$  au **Sc** par rapport au **LC**, selon un balayage entre une tension négative et une tension positive limites, choisies de telle sorte que le niveau de Fermi du **Sc** passe par son 15 niveau intrinsèque en surface,  $V_p$  évoluant ainsi avantageusement dans une gamme de tension correspondant au régime de désertion et de faible inversion du **Sc**.

Cette polarisation continue est associée, d'une part à l'éclairement périodique selon l'étape **c** et d'autre part, à une mesure des variations de  $V_{bp}$  suivant l'étape **d**. Cette mesure est effectuée comme suit :

20 

- recueil du photopotentiel ( $V_{ph}$ ) aux bornes du **Sc** (entre **Sc** et **LC**) et/ou du photocourant ( $I_{ph}$ )
- calcul des impédances optoélectrochimiques en phase  $Z_{op}$  et/ou en quadrature  $Z_{oq}$  pour chaque valeur de  $V_p$ ,
- réalisation de la (ou des) courbe(s)  $Z_{op}$  et/ou  $Z_{oq}$  et/ou  $V_{ph}$  et/ou  $I_{ph}$  en fonction de  $V_p$ ,
- et suivi du déplacement de cette (ou ces) courbe(s) parallèlement à l'axe des abscisses (potentiels  $V_p$ ), ledit déplacement correspondant aux variations de  $V_{bp}$  recherchées.

25

30 Les impédances optoélectrochimiques  $Z_{op}$  et  $Z_{oq}$  permettent d'accéder aux propriétés énergétiques de la structure **Sc/Is-So** ainsi que de sa zone interfaciale avec le **LC**, et notamment aux différents effets de charge pouvant intervenir aux interfaces. Ces impédances optoélectrochimiques  $Z_{op}$  et  $Z_{oq}$  sont liées au photopotentiel  $V_{ph}$  et au courant  $I_{hv}$ , générés suite à l'excitation lumineuse périodique du **Sc**, par ailleurs soumis à une polarisation continue. En effet, l'éclairement modulé - c - du **Sc** par des 35 photons d'énergie supérieure ou égale à la largeur de sa bande interdite, génère des paires électrons-trous, porteurs de charge. Ces derniers sont séparés sous l'effet du

champ électrique existant dans la zone de charge d'espace du semi-conducteur Sc (dans la zone en contact avec le diélectrique Is). Ce phénomène entraîne l'apparition de  $I_{hv}$  périodique dans le semi-conducteur Sc, ce qui conduit aux bornes de la structure Sc/Is-So à un photopotentiel  $V_{ph}$  périodique ou à un photocourant  $I_{ph}$  périodique.

Il est donc possible d'utiliser indifféremment  $V_{ph}$  et/ou  $I_{ph}$  et/ou les composantes impédimétriques  $Z_{op}$  et/ou  $Z_{oq}$ , en tant que paramètres de transduction des phénomènes énergétiques d'effet de charge, directement liés aux appariements auxquels on s'intéresse.

Dans le cas où la puissance de l'éclairement selon l'étape c est faible, les 10 impédances optoélectrochimiques  $Z_{op}$  et  $Z_{oq}$  sont des fonctions de transfert reliant  $V_{ph}$  à  $I_{hv}$  induit par l'éclairement modulé. Plus précisément, les impédances optoélectrochimiques  $Z_{op}$  et  $Z_{oq}$  de la région de la zone de charge d'espace du Sc sont directement proportionnelles aux valeurs efficaces des composantes en phase et 15 en quadrature du  $V_{ph}$  mesuré. Le coefficient de proportionnalité dépend de l'intensité ou de la puissance, de l'éclairement.

Le photopotentiel est donc l'image de l'impédance opto-électrochimique de la structure.

Dans cette variante, on préfère que l'éclairement soit non seulement faible 20 mais également sensiblement sinusoïdal.

Dans le cas où l'éclairement mis en oeuvre à l'étape c est fort, on accède aux variations de  $V_{bp}$ , dans le cadre de l'étape d, de préférence :

25 ■ en recueillant  $V_{ph}$  et/ou  $I_{ph}$ ,  
 ■ en établissant la courbe  $V_{ph} = f(V_p)$  et/ou  $I_{ph} = f(V_p)$ ,  
 ■ et en suivant le déplacement de cette (ou ces) courbe(s) parallèlement à l'axe des abscisses (potentiels  $V_p$ ), ledit déplacement correspond aux  $\Delta V_{bp}$  recherchées.

En effet, à fort éclairement, si la charge de surface varie du fait de l'appariement des 30 PN du LC avec les PNc des sondes So de la structure Sc/Is, il s'ensuit une modification du  $V_{bp}$  qui se traduit par un glissement de la courbe de la valeur efficace du photopotentiel  $V_{ph}$  et/ou du photocourant  $I_{ph}$ , parallèlement à l'axe des potentiels de polarisation de la structure.

Selon l'invention, les notions de faible et fort éclairement sont définies comme suit :

35 - le faible éclairement est un éclairement qui conduit à une perturbation du second ordre de la structure par rapport à l'équilibre thermodynamique dans

l'obscurité. Il est de préférence inférieur ou égal à 10  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  et préférentiellement à 1  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

- le fort éclairement est un éclairement qui perturbe fortement l'équilibre thermodynamique de la structure dans l'obscurité. Il est de préférence supérieur à 10  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

Dans les variantes à faible et à fort éclairement évoquées ci-dessus, pour la description du premier mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, les calculs de Zop et/ou Zoq, le pilotage et l'acquisition des mesures, ainsi que le traçage des courbes Zop et/ou Zoq et/ou Vph et/ou Iph = f(Vp), se font par l'intermédiaire 10 d'un microordinateur, selon des procédures connues en soi (notamment calcul des impédances selon la loi d'Ohm).

Conformément à un deuxième mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on adopte la méthodologie suivante :

- Δ dans l'étape b : on fixe le niveau de Fermi du Sc sensiblement au niveau intrinsèque en surface du Sc, en imposant une tension de polarisation Vpi correspondant environ à l'abscisse du point d'infexion de la courbe Vph = f(Vp) ou Zoq = f(Vp) ou Iph = f(Vp), Vph, Zoq et Iph étant tels que définis supra (p.9 1.4 à 7), de telle sorte que l'ordonnée de ce point d'infexion corresponde environ à Vph max/2, Zoq max/2 ou Iph max/2 ;
- Δ et dans l'étape d, on appréhende les variations  $\Delta V_{bp}$  de Vbp :
- (i) par la mesure de l'évolution de Vph et/ou Iph et/ou Zoq, dans le cas où les variations  $\Delta V_{bp}$  sont faibles et en considérant que  $V_{bp}$  varie linéairement avec Vph, alors  $\Delta V_{bp} = K\Delta V_{ph}$ , où K représente la pente de la courbe  $V_{ph} = f(Vp)$  au point d'infexion ;
- (ii) et/ou par la prise en compte des variations de la tension de polarisation  $\Delta V_p$ , rendues nécessaires pour réguler et maintenir constant Vph max/2, Zoq max/2 ou Iph max/2, cet ajustement  $\Delta V_p$  étant le reflet de  $\Delta V_{bp}$ .

Il s'agit donc selon ce mode de mise en oeuvre de polariser la structure Sc/Is de telle sorte que le niveau de Fermi soit au voisinage de la position intrinsèque du semi-conducteur. Le potentiel imposé Vpi est voisin du potentiel correspondant au point d'infexion de la courbe d'allure sigmoïdale du photopotentiel Vph, du photocourant Iph ou de l'impédance optoélectrochimique en quadrature Zoq en fonction du potentiel de polarisation Vp.

Au sens de l'invention, on entend par « voisinage » du niveau de Fermi par rapport au niveau intrinsèque en surface du Sc, la position voisine du milieu de la bande interdite du semiconducteur à sa surface au contact de l'isolant Is, dans une plage telle que le semiconducteur se trouve en surface en situation de désertion ou 5 faible inversion, de telle sorte que le photopotentiel  $V_{ph}$ , et/ou le photocourant  $I_{ph}$ , et/ou l'impédance optoélectrochimique en quadrature  $Z_{oq}$  varie beaucoup avec le potentiel de polarisation  $V_p$ .

Par suite, «  $V_{pi}$  correspondant environ au potentiel du point d'inflexion », doit s'entendre, selon l'invention, par une plage d'incertitude de  $\pm 0,5$  Volt.

10 L'ordonnée du point d'inflexion de ces courbes  $V_{ph}$ ,  $I_{ph}$  ou  $Z_{oq} = f(V_p)$  est avantageusement choisie comme paramètre de référence à maintenir constant dans le cadre de cette régulation par ajustement de  $V_p$ . La référence est en pratique donnée par la valeur maximale qu'atteint  $V_{ph}$ ,  $I_{ph}$  ou  $Z_{oq}$  dans chacune des courbes sigmoïdales caractéristiques.

15  $V_{ph \ max}$ ,  $I_{ph \ max}$  et  $Z_{oq \ max}$  correspondent en d'autres termes à la valeur maximale du photopotentiel, du photocourant et de l'impédance optoélectrochimique en quadrature, respectivement, lorsque le semi-conducteur est en régime de forte inversion.

20 Dans la mesure où la détermination de la valeur de consigne  $V_{pi}$  passe par la prise en compte de l'abscisse et de l'ordonnée du point d'inflexion d'au moins l'une des courbes  $V_{ph}$  ou  $Z_{oq}$  ou  $I_{ph} = f(V_p)$ , il est prévu dans ce deuxième mode de mise en oeuvre d'établir au moins l'une desdites courbes, de préférence comme décrit supra pour le premier mode de mise en oeuvre.

25 La variante (i) de l'étape d selon ce deuxième mode de mise en oeuvre consiste à suivre  $\Delta V_{bp}$  par la mesure de la variation de  $V_{ph}$ ,  $I_{ph}$  ou  $Z_{oq}$ , après calibration. Cela revient à établir la courbe  $V_{ph}$  et/ou  $I_{ph}$  et/ou  $Z_{oq} = f(t)$  et de considérer que toute variation  $\Delta V_{ph}$ ,  $\Delta I_{ph}$  ou  $\Delta Z_{oq}$  correspond à une variation  $\Delta V_{bp}$ . La variante (i) est utilisable dans le cas d'une variation modérée du  $V_{bp}$  permettant d'établir une relation simple (linéaire par exemple) entre  $\Delta V_{ph}$  et  $\Delta V_{bp}$ .

30 En pratique, on préfère recourir à la variante (ii) de l'étape d selon le deuxième mode de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention. Dans cette variante, on maintient  $V_{ph \ max}/2$  constant en ajustant la polarisation  $V_p$  de la structure, de préférence par l'intermédiaire d'une régulation électronique.

Le  $\Delta V_p$  de régulation correspond au  $\Delta V_{bp}$  que l'on cherche à mesurer.

Selon une disposition avantageuse de l'invention, la régulation électronique que l'on peut mettre en oeuvre dans le cadre de la variante (ii) de prise en compte de  $\Delta V_p$ , s'effectue de la façon suivante :

- on détecte  $v_{ph}$ ,
- 5 - on amplifie éventuellement le signal  $v_{ph}$ ,
- on redresse éventuellement ce signal de manière à disposer d'un signal continu  $v'_{ph}$ ,
- on compare ce signal  $v_{ph}$  continu à un signal de référence  $U$  correspondant sensiblement à la valeur de  $v'_{ph}$  max/2 (ordonnée de 10 point d'inflexion de la courbe  $v'_{ph} = F(V_p)$  soit  $v'_{ph}$  max/2),
- on recueille la différence  $\Delta(v'_{ph}-U)$  entre  $V'_{ph}$  et  $U$ ,
- on amplifie éventuellement  $\Delta(v'_{ph}-U)$ ,
- on applique  $\Delta(v'_{ph}-U)$  éventuellement amplifiée entre **Sc** et **LC** en complément de  $V_p$ ,
- 15 - on enregistre  $\Delta(V'_{ph}-U)$ .

L'intérêt d'une telle procédure de régulation résulte du fait que le potentiel électriquement imposé est directement et linéairement l'image des variations de  $V_{bp}$  provoquées par les interactions à la surface du diélectrique **Is**. Il est donc indépendant des propriétés de la structure et permet d'obtenir une bonne sensibilité et 20 une excellente reproductibilité de mesure.

Selon la nomenclature adoptée dans le présent exposé,  $V_{ph}$  désigne aussi bien le photopotentiel primaire  $v_{ph}$  mesuré entre **Sc** et **LC** que  $v'_{ph}$  correspondant à  $v_{ph}$  redressé et éventuellement amplifié.

S'agissant de l'étape c d'éclairement, qui est commune aux deux modes 25 de mise en oeuvre évoqués ci-dessus, il y a lieu de préciser que ledit éclairement peut être effectué en regard de n'importe quelle zone des faces externes de la structure **Sc/Is-So**, y compris sur son épaisseur le cas échéant, voire sur la totalité de l'extérieur de cette structure.

En d'autres termes, l'éclairement périodique de la structure **Sc/Is** est donc effectué 30 soit en regard de la ou des faces externes du **Sc**, soit en regard de la ou des faces externes de l'isolant **Is**, soit en regard de toutes les faces externes de la structure.

De préférence, pour l'étape c, on choisit la longueur d'onde de l'éclairement  $\lambda$  de telle sorte qu'elle soit supérieure ou égale à  $\lambda_0 = \frac{1240}{E(\text{énergie bande interdite})}$  nm, de 35 préférence comprise entre 100 et 3000 nm,  $E$  étant l'énergie de la bande interdite de **Sc** exprimée en électron-volt.

Ce seuil  $\lambda_0$  est fonction de la nature du semi conducteur.

Selon un troisième mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on peut éliminer radicalement les réponses non spécifiques, en mettant en oeuvre une mesure différentielle, selon laquelle, on fait intervenir dans le capteur d'affinité au moins une autre structure **Sc/Is** de référence, dans laquelle **Is** n'est pas fonctionnalisé par **So**, et en suivant la différence entre les **Vbp** mesurées par les 2 capteurs, ainsi que la variation de cette différence.

5 Dans ce troisième mode de mise en oeuvre la structure **Sc/Is-So** de mesure et la structure **Sc/Is** de référence sont mises au contact du même milieu **LC**. Elles sont polarisées de la même façon, de préférence au moyen d'une même contre-électrode, 10 une électrode de référence n'étant pas nécessaire. Enfin, conformément à l'étape c, elles sont soumises à un même éclairement de lumière modulée.

15 Par ailleurs, les moyens d'interprétation des signaux recueillis mis en oeuvre dans l'étape d sont choisis de manière à permettre le suivi de la différence entre les potentiels de bande plate **Vbp0** et **Vbp1** propres aux deux structures **Sc/Is** et **Sc/Is-So**, respectivement.

Cette disposition permet d'obtenir une mesure très précise et en continu de la variation du **Vbp1** de la structure **Sc/Is-So** fonctionnalisé, en s'affranchissant des phénomènes parasites pouvant apparaître et qui sont liés à d'autres paramètres que l'appariement et, en particulier, que l'hybridation **PN/PNc**.

20 Un quatrième mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention est caractérisé, en ce que, dans une étape préalable ao, on fonctionnalise différentes zones de la surface d'une couche d'isolant **Is** d'une même structure **Sc/Is**, par plusieurs sondes **So** différentes de par la nature des **PNc** qui les composent, et on réalise ensuite à l'aide de cette structure l'analyse de **LC** contenant un ou différents substrats **PN** :

25

- par éclairements successifs des zones de la surface de l'**Is**, lesdites zones étant chacune fonctionnalisée par une même **So** (**PNc** identiques), la nature des **So** variant d'une zone à l'autre,
- et par recueil et interprétation des  $\Delta Vbp$ .

Ce quatrième mode de mise en oeuvre correspond à la multidétection de substrats, en 30 particulier de **PN**, de natures différentes, dans le domaine de la génétique. La multidétection selon l'invention permet d'accéder à des méthodes de détection simple et rapide de maladies virales et de maladies génétiques. Il est également envisageable de réaliser des vérifications de compatibilité tissulaire, de même que des cartographies de populations hétérogènes de polynucléotides, par exemple de génomes. Cela 35 constitue en outre un outil pour l'étude de la mutation des gènes, de l'expression des gènes, ou du séquençage génomique.

L'intérêt de la multidétection selon ce quatrième mode de mise en oeuvre réside dans la simplicité méthodologique et structurelle du procédé et du dispositif correspondants.

De manière commune aux troisième et quatrième modes de mise en oeuvre évoqués ci-dessus, à savoir respectivement la mesure différentielle et la multidétection, il y a lieu de noter que l'étape de mesure directe ou indirecte de  $\Delta V_{bp}$  peut être réalisée conformément à la procédure décrite pour le premier mode de mise en oeuvre dans l'une ou l'autre de ces variantes à faible ou à fort éclairement, de même que selon la procédure propre au deuxième mode de mise en oeuvre, quelle que soit la variante (i) ou (ii) retenue.

Il va de soi que l'invention n'est pas limitée à ces quatre modes de mise en oeuvre, mais elle englobe également toutes les méthodes de mesure envisageables et analogues, fondées sur la reconnaissance de la variation du potentiel de bandes plates ( $\Delta V_{bp}$ ) d'une structure Sc/Is-So possédant une zone sensible faite de sondes So à base de substances biologiques de reconnaissance SBR (e.g. des PNc) aptes à réagir spécifiquement avec des substances biologiques électriquement chargées SBC (e.g. des PN) dans un milieu LC.

Avantageusement, les substrats à analyser sont des PN, de préférence choisis dans la liste suivante :

nucléotides, oligonucléotides, polynucléotides, acides nucléiques (ADN ou ARN) ainsi que les analogues et les mélanges desdits substrats.

Conformément à l'invention, les sondes So mises en oeuvre dans le procédé sont des moyens de reconnaissance spécifique, en particulier des PNc, non-marqués, c'est-à-dire non porteurs de moyens de révélation de l'appariement PN/PNc (fluorescence, colorimétrie, radioactivité).

Bien que l'on priviliege des substances biologiques du type séquence polynucléotidique (ARN, ADN, gène, plasmide ou tout autre matériel génétique), cela n'exclut pas pour autant d'autres substances biologiques du type antigène, haptène, anticorps ou, de manière générale, toute espèce d'un couple formé par une macromoléculaire biologique et son complément spécifique. Comme exemples de couples ou de paires d'appariement spécifique, on peut citer : antigène-anticorps, haptène-anticorps, ADNc/ADN, ARNc/ARN, poly dT-ARNm, eucaryote, lectineglycoconjugué, marqueur de cellules (ou de microorganismes)-cellules (ou microorganisme), HcG- récepteur tissulaire et T3 - TGB (thyroxin binding protein).

Le procédé selon l'invention passe tout d'abord par l'immobilisation d'au moins un type de ces espèces biologiques PNc réactives pour constituer la ou les

sondes **So**. Celle-ci peut se faire directement sur la couche isolante ou à l'aide d'un matériau intermédiaire (composés d'espacement par exemple), accolé à l'isolant **Is** et apte à recevoir par liaison physique (e.g. adsorption-absorption) et/ou chimique (e.g. liaison covalente), les ligands biologiques spécifiques **PNc**.

5 Selon l'invention, il est parfaitement envisageable de prévoir une des sondes **So** hétérospécifiques, formées d'espèces biologiques **PNc** de natures différentes, aptes à réagir avec leurs complémentaires.

10 Le milieu liquide conducteur **LC** utilisé peut être toute solution tampon compatible avec les substances biologiques considérées **PN**. Ce milieu liquide **LC** possède avantageusement une conductivité équivalente à celle d'une solution aqueuse de NaCl ayant une concentration pouvant aller de 0,005M à 3M et préférentiellement de l'ordre de 0,1 M.

15 Le pH du milieu liquide peut être compris entre 0 et 12, de préférence entre 6 et 8 de façon à favoriser les appariements par bioaffinité. La stringence du milieu liquide peut également être ajustée pour favoriser l'hybridation.

Les interactions non spécifiques, par échange d'ions ou par interactions hydrophobes, peuvent être supprimées en tout ou partie à l'aide de tampon de force ionique appropriée. (e.g. Tris-HCl/Tris-base).

20 Avantageusement, la température de mesure peut être comprise entre 0 et 50°C. Elle est contrôlée plus précisément de façon à favoriser les réactions biochimiques concernées.

La présente invention a également pour objet un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé tel que décrit supra, ledit dispositif étant caractérisé en ce qu'il comprend :

25 - au moins un capteur d'affinité formé par au moins une structure **Sc/Is-So** dans laquelle la ou les sondes **So** comprennent des ligands **SBR** aptes à s'hybrider spécifiquement avec les substances biologiques **SBC** à analyser, contenues dans le milieu liquide conducteur **LC**, en provoquant un phénomène d'effet de charge, à l'origine des  $\Delta V_{bp}$  du **Sc**,

30 - des moyens de polarisation du **Sc** par rapport au **LC**,

- des moyens d'éclairage du **Sc** du capteur,

- des moyens de mesure du photopotentiel **Vph** ou du photocourant **Iph**,

35 - des moyens de transformation des signaux recueillis en variation de **Vbp**,

- et des moyens de calcul et d'interprétation des  $\Delta V_{bp}$  en termes d'identification et/ou de dosage des substances biologiques SBC.

Grossièrement, ce dispositif comprend donc

- d'une part une ou des structures multicouches semi-conductrices simples, assimilables à des électrodes de mesure,

5 - de deuxième part, une source de lumière modulée pour l'éclairage de cette ou ces structures,

- et de troisième part, des périphériques électroniques de polarisation électrique, de mesure, de calcul et d'interprétation.

10 Les mesures du photopotentiel  $V_{ph}$  et/ou des impédances optoélectrochimiques en phase  $Z_{op}$  et/ou en quadrature  $Z_{oq}$  sont réalisées dans une configuration de circuit ouvert c'est-à-dire que le circuit de mesure doit comporter une très forte impédance de charge.

15 Les mesures de photocourant  $I_{ph}$  sont réalisées avantageusement dans une configuration de circuit fermé (court-circuit).

Ces moyens techniques relèvent de technologies classiques et parfaitement maîtrisées par les hommes de l'art.

20 En outre, ce dispositif bénéficie d'un faible coût de revient. Il peut être produit aisément à l'échelle industrielle et offre une grande fiabilité et une bonne reproductibilité de mesure.

De surcroît, le caractère déjà miniaturisé voire « miniaturisable » des capteurs d'affinité constituant le dispositif, ouvre des perspectives prometteuses notamment pour certaines applications *in vivo* ou *in vitro*.

25 De manière préférée, mais non limitative, l'électrode de mesure (c'est-à-dire la structure multicouches **Sc/Is-So**) du capteur d'affinité du dispositif, est formée par au moins une plaquette de **Sc**, de préférence en silicium, recouverte sur l'une de ses faces d'au moins une couche **Is** d'isolant de préférence en silice, à la surface de laquelle sont fixées au moins une sonde **So** sensible comprenant au moins un ligand d'appariement biospécifique, de préférence des polynucléotides **PNC** de reconnaissance spécifique par hybridation,

30 ce capteur comportant également au moins un contact ohmique permettant la connexion de la structure **Sc/Is-So**, notamment, avec les moyens de polarisation et/ou les moyens de mesure de  $V_{ph}$ .

35 Le dispositif comprend outre cette structure **Sc/Is-So**, au moins une électrode auxiliaire, éventuellement prévue sur la couche **Is** de la Structure **Sc/Is-So**.

Avantageusement, la couche de matériau diélectrique bloquant **Is** est par exemple, une couche d'oxyde et/ou de nitrure ou tout autre matériau minéral ou organique de faible épaisseur, empêchant ou limitant les phénomènes faradiques.

Cette structure est associée à un milieu liquide conducteur contenant les substances **SBC** à doser à détecter ou à identifier **LC**.

En pratique, le silicium choisi à titre de semi-conducteur est du type n ou p moyennement dopé, de préférence à hauteur de  $10^{15}$  à  $10^{19}$  cm<sup>-3</sup>, de préférence  $10^{16}$  cm<sup>-3</sup>. L'épaisseur de la plaquette de silicium est, par exemple, comprise entre 0,01 et 2 mm.

10 La couche isolante **Is** est avantageusement constituée de silice ou de nitrure de silicium. Elle a pour fonction d'anéhiler d'éventuels processus faradiques qui pourraient perturber les mesures, par l'intermédiaire de signaux électriques parasites. Cette couche **Is** permet également d'éviter les difficultés liées à une possible corrosion du matériau semi-conducteur par le milieu conducteur **LC** en contact.

15 L'épaisseur de cette couche **Is** est comprise entre 1 et 500 nanomètres, de préférence entre 1 et 50, et plus préférentiellement encore est de l'ordre de 10 nanomètres. La couche diélectrique **Is** supporte les sondes **So PNc**, lesquelles constituent ce qu'on pourrait dénommer membrane bio-réceptrice en contact avec le milieu **LC**.

20 **DESCRIPTION DES FIGURES :**

- La **Figure 1** est une représentation schématique du dispositif d'analyse qualitative et/ou quantitative de substances biologiques, de préférence polynucléotidiques **PN** présent dans un milieu liquide conducteur **LC**, conforme à 25 l'invention.

- Les **Figures 2 et 3** sont des vues en coupe transversale droite, de variantes de réalisation du capteur d'affinité montré à la **Figure 1**.

- La **Figure 4** représente le schéma du circuit électrique de mesure des impédances optoélectrochimiques **Zop**, **Zoq** du capteur d'affinité selon l'invention, 30 conformément au premier mode de mise en oeuvre du procédé, dans sa variante faible éclairement.

- La **Figure 5** représente le schéma synoptique d'une forme d'exécution particulière du dispositif de mesure selon l'invention correspondant à la variante ii de la deuxième forme de mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

- La Figure 6 est une représentation schématique en coupe transversale droite d'une forme d'exécution du dispositif selon l'invention, à savoir le capteur différentiel correspondant au troisième mode de mise en oeuvre du procédé.

5 - La Figure 7 annexée est un schéma de principe de la structure multicapteur Sc/Is-So<sub>1</sub> à So<sub>n</sub>.

- La figure 8 annexée montre les courbes Zop et Zoq = F(Vp) obtenues.

- La Figure 9 correspond aux courbes d'impédances obtenues à chaque étape d'élaboration d'une structure active fonctionnalisée pour la reconnaissance de brins simples d'ADN.

10 - La Figure 10 est une courbe Vph = F(Vp) obtenue à l'exemple 3 pour illustrer un premier mode de mise en oeuvre du procédé à fort éclairement.

- La Figure 11 donne la réponse en  $\Delta Vp$  de la structure fonctionnalisée pour la détection d'oligonucléotides. Exemple 4 - 2ème mode de mise en oeuvre - variante (ii) -

15 \*\*\*

La présente invention sera comprise à la lumière de la description qui suit, d'exemples de réalisation du dispositif et de mise en oeuvre du procédé qu'elle concerne, en référence aux dessins annexés. Ces illustrations non limitatives font ressortir de nombreux avantages et variantes de l'invention.

20 \*\*\*

La Figure 1 montre le dispositif selon l'invention qui comprend un capteur d'affinité 1 formé par une structure 7 Sc/Is-So au contact, par sa face supportant les So, avec un milieu liquide conducteur LC, désigné par la référence 2. Ce dispositif comporte également des moyens de polarisation 3, des moyens d'éclairement 4, des moyens 5 de mesure de Vph, et une unité 6 de calcul et de commande comprenant des moyens de transformation des signaux recueillis en variation de Vbp et des moyens de calcul et d'interprétation des  $\Delta Vbp$  en terme d'identification et/ou de dosage des substances biologiques électriquement chargées à analyser, également désignées SBC.

25 Le capteur d'affinité 1 est constitué par une structure 7 Sc/Is-So, elle-même formée par une plaque Sc de silicium 7.1, une couche d'isolant Is en silice 7.2 et des sondes So désignées par la référence 7.3, fixées sur la surface de l'isolant Is 7.2 pour fonctionnaliser cette dernière. Selon une variante, on peut déposer éventuellement à la surface, une couche fonctionnelle permettant de mieux accrocher les sondes So. Le capteur d'affinité 1 est pourvu sur sa face externe opposée à celle porteuse des sondes So 7.3, d'un contact ohmique 8 relié aux moyens de polarisation 3. Le contact

30

35

ohmique 8 est isolé du milieu LC 2 par l'intermédiaire d'un joint 8<sub>1</sub> périphérique. Ce dernier coopère par contact étanche avec un support isolant 8<sub>2</sub> sur lequel repose en somme le capteur 1. Avantageusement, ces sondes sont constituées par des Substances Biologiques de Reconnaissance spécifique (SBR) des SBC. Dans le

5 présent exemple, les SBC et les SBR sont des polynucléotides PN et PNc.

Une électrode de référence 9 et une contre-électrode 10 baignent également au sein du milieu 2 conducteur LC avec le capteur d'affinité 1. Ces deux électrodes 9 et 10 sont connectées aux moyens de polarisation 3.

Conformément à une caractéristique préférée de l'invention, une résistance de charge

10 élevée est prévue dans le circuit potentiostatique de mesure. Avantageusement, cette résistance élevée R<sub>L</sub> est insérée dans la connexion reliant la contre-électrode aux moyens de polarisation 3. En pratique, la résistance R<sub>L</sub> est préférablement supérieure à 100 kΩ, de préférence 50 MΩ et plus préférentiellement encore est de l'ordre de 100 MΩ.

15 Les Figures 2 et 3 montrent chacune une variante de réalisation du capteur d'affinité 1 dans laquelle la structure 7 constitue le fond d'une cellule de mesure comprenant des parois 1<sub>1</sub> et un joint 1<sub>2</sub> assurant l'étanchéité entre le fond 7 et lesdites parois 1<sub>1</sub>.

20 Les éléments communs aux Figures 1 à 3 sont désignés par les mêmes références.

La variante de la Figure 2 se distingue de celle de la Figure 3 en ce que la zone sensible comprenant les sondes So 7<sub>3</sub> est délimitée dans la première alors qu'elle ne l'est pas dans la seconde (toute la surface de l'IS comporte des sondes So 7<sub>3</sub>).

25 Les moyens de polarisation 3 du dispositif selon l'invention sont, de préférence, constitués par un potentiostat adapté, ayant par exemple une forte constante de temps (supérieure à 1 s). Il permet la polarisation de la structure tout en ne perturbant pas le photopotentiel Vph.

30 Dans l'exemple montré sur le schéma synoptique de la Fig. 1, qui correspond à une réalisation préférée de l'invention, les moyens d'éclairement 4 comportent au moins une source de lumière, en l'occurrence une, disposée

■ soit en regard de la membrane bioréceptrice 7.3. formée par les sondes So fixées sur l'isolant Is 7.2,

■ soit en regard de la face du Sc 7.1 opposée à la face 7.3. porteuse du contact ohmique 8 (hypothèse symbolisée par des pointillés sur le schéma de la

35 Figure 1),

■ soit en regard de tout ou partie de l'extérieur de la structure 7.

Cette source lumineuse 4 est, par exemple, constituée par un laser tel qu'un laser hélium-néon ayant une longueur d'onde d'émission égale = 632,8 nm.

Avantageusement, le faisceau lumineux traverse un modulateur acousto-optique (non représenté sur **Fig.1**) dont le contrôleur est piloté par un générateur basse fréquence, 5 désigné par la référence 4.1 sur la **Fig.1**.

Un filtre non représenté permet d'ajuster la puissance lumineuse à des valeurs inférieures, égales ou supérieures, au seuil déterminant les plages de faible éclairement et de fort éclairement. De préférence, la puissance lumineuse est de l'ordre ou inférieure ou égale à  $1\mu\text{W}/\text{cm}^2$  pour les conditions de faible éclairement et supérieure 10 à  $10\mu\text{W}/\text{cm}^2$  pour le fort éclairement.

Les moyens 5 de mesure de  $V_{ph}$  sont, en pratique, constitués, par exemple, par un adaptateur d'impédance présentant une impédance d'entrée comprise entre  $10^8\Omega$  et  $10^{12}\Omega$ , plus préférentiellement de l'ordre de  $10^{10}\Omega$ .

Les moyens de mesure 5 comprennent également un organe de détection synchrone piloté par le générateur basse fréquence 4.1. qui, on l'a vu ci-dessus, détermine par ailleurs, la modulation de l'éclairement. Cet organe de détection synchrone donne les 15 composantes en phase et en quadrature de  $V_{ph}$ .

Le micro-ordinateur 6 comprend les moyens de transformation des signaux recueillis en variation de  $V_{bp}$  ainsi que les moyens de calcul et d'interprétation  $\Delta V_{bp}$ , en 20 termes d'identification et/ou de dosage des substances biologiques en l'occurrence des polynucléotides PN.

Le schéma du circuit électrique de mesure est représenté sur la **Fig. 4**.

Dans la variante à faible éclairement, les impédances optoélectrochimiques  $Z_{op}$  et  $Z_{oq}$  sont les fonctions de transfert reliant  $V_{ph}$  à l'intensité de l'éclairement.

25 Comme le montre la **Fig. 4**, l'effet de l'éclairement peut être représenté par un générateur de courant en parallèle avec la région de charge d'espace dont l'impédance, notée  $Z_{sc}$ , inclut les paramètres liés à la surface.  $Z_d$  est l'impédance du diélectrique. Elle peut être représentée par une capacitance pure.  $R_{e1}$  et  $R_{e2}$  sont les impédances de la solution electrolytique, respectivement, entre l'électrode de travail et 30 l'électrode de référence, et entre l'électrode de référence et la contre-électrode.  $Z_p$  est la résistance interne du potentiostat.  $R_L$  est la résistance de charge introduite dans le circuit potentiostatique de mesure. Son rôle est de conférer au circuit de mesure les propriétés de circuit quasi ouvert vis-à-vis du photopotentiel, tout en permettant la polarisation de la structure ; sa valeur doit donc être suffisamment élevée par rapport 35 aux autres impédances intervenant dans la mesure.  $V_{ph}$  est le photopotentiel mesuré et  $V_1$  est le photopotentiel qui apparaît aux bornes du semi-conducteur. D'après le

schéma électrique, le courant total  $I_{hv}$  généré par l'éclairement a deux composantes :  $I_1$  qui traverse le semiconducteur et  $I_2$  qui circule dans le circuit de mesure. On peut alors écrire les relations suivantes :

$$I_{hv} = I_1 + I_2 = (V_1 / Z_{sc}) + (V_1 / (R_L + R_{e1} + R_{e2} + Z_d + Z_p))$$

5 si  $R_L \gg R_{e1} + R_{e2} + Z_d + Z_p$  alors :  $V_{ph} = V_1$  et  $I_{hv} = (V_{ph} / Z_{sc}) + (V_{ph} / R_L)$   
d'où  $Z_{sc} = V_{ph} / I_{hv}$ .

Ainsi, les impédances optoélectrochimiques en phase et en quadrature de la région de la zone de charge d'espace du semi-conducteur sont directement proportionnelles aux 10 composantes du photopotentiel mesuré : le coefficient de proportionnalité dépend de l'intensité de l'éclairement.

La mesure des impédances optoélectrochimiques peut donc être utilisée pour la détection du processus d'appariement, en particulier d'hybridation de PN/PNc, lequel processus étant le reflet quantitatif et qualitatif des SBC (PN) à analyser.

15 Les Exemples 1 et 2 ci-après illustrent la *variante faible éclairement* du *premier mode* de mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

S'agissant de la *variante fort éclairement* de ce premier mode, il consiste à accéder aux variations du potentiel de bande plate  $V_{bp}$  du Sc, consécutives au phénomène de reconnaissance biologique, par l'intermédiaire de la valeur efficace de  $V_{ph}$  (ou selon une variante de  $I_{ph}$ ). Dans ce cas, l'éclairement modulé - de préférence à basse 20 fréquence - utilisable n'est pas nécessairement sinusoïdal, mais peut être simplement périodique. Ainsi, dans le dispositif de la Figure 1, si la charge de surface varie avec la présence de l'espèce cible PN dans le milieu LC désigné par la référence 2, cela entraîne un  $\Delta V_{bp}$ , qui se traduit par un glissement de la courbe de la valeur efficace de  $V_{ph}$ , parallèlement à l'axe des potentiels de polarisation de la structure.

25 L'exemple 3 ci-après illustre cette *variante fort éclairement* du *premier mode* de mise en oeuvre du procédé de l'invention, à l'aide du dispositif adapté.

Selon le *deuxième mode* de mise en oeuvre du procédé de l'invention, on polarise la structure Sc/Is-So, de telle sorte que le niveau de fermi du Sc soit au voisinage de la position intrinsèque en surface du Sc. Le potentiel  $V_p$  alors imposé est 30 voisin du potentiel correspondant au point d'infexion de la courbe d'allure sigmoïdale de la valeur efficace de  $V_{ph}$ , de  $I_{ph}$  ou de  $Z_{oq}$ .

La mesure de la variation de la valeur efficace de  $V_{ph}$  de  $I_{ph}$  ou de  $Z_{oq}$  après calibration, permet d'accéder au  $\Delta V_{bp}$ .

Selon la *variante (ii)*, on ajuste la valeur efficace de  $V_{ph}$  à une valeur 35 proche de sa valeur  $\frac{V_{ph,max}}{2} = V_{phi}$  en jouant sur la polarisation continue initiale, qui sera une valeur de consigne  $V_{pi}$ . On maintient ensuite constante la valeur efficace

de  $V_{phi}$ ,  $I_{phi}$  ou de  $Z_{phi}$ , en ajustant  $V_p$  par rapport à la valeur de consigne  $V_{pi}$  de la structure, au moyen d'une régulation électronique. Cet ajustement de la polarisation est directement l'image de  $\Delta V_{bp}$ . Les valeurs efficaces de  $V_{ph}$ , de  $I_{ph}$  et de  $Z_{q}$  sont respectivement  $\frac{V_{ph\_max}}{2}$ ,  $\frac{I_{ph\_max}}{2}$ ,  $\frac{Z_{q\_max}}{2}$ . Elles représentent chacune

5 sensiblement l'ordonnée du point d'inflexion de la courbe correspondante.

L'exemple 4 illustre le deuxième mode de mise en oeuvre sans fort éclairement dans la variante (ii).

Pour la mise en oeuvre de cette variante (ii), on a recours à une forme particulière d'exécution du dispositif selon l'invention caractérisé en ce qu'il comprend des 10 moyens d'évaluation de la variation du signal  $V_{ph}$  ou  $I_{ph}$ , ou  $Z_{q}$  par rapport à une référence  $U$  imposée par une polarisation  $V_p$  se surajoutant à l'éclairement ainsi que des moyens de correction et de régulation de la variation par action sur les moyens de polarisation.

La Figure 5 annexée présente le schéma synoptique d'un exemple de cette forme 15 particulière d'exécution du dispositif selon l'invention. Dans cet exemple, on choisit  $V_{ph}$  comme signal traceur.

Comme le montre cette Figure 5, dans laquelle les éléments communs avec ceux de la Figure 1, sont repérés par les mêmes références, le photopotentiel  $v_{ph}$  est détecté aux bornes du capteur d'affinité 1 (cellule de mesure) au moyen d'un adaptateur 20 d'impédance 14 présentant une forte impédance d'entrée de manière à ne pas perturber la structure. Le signal est ensuite amplifié au moyen d'un amplificateur alternatif basse fréquence 15, transformé en un signal continu  $v'_{ph}$  grâce à une détection synchrone 5 et à un circuit RC 16 qui permet de diminuer le bruit et de stabiliser la régulation.

25 Le signal continu  $v'_{ph}$  est amplifié au moyen d'un amplificateur continu 17, de gain  $G_{17}$ .  $G_1$  est le gain de l'ensemble amplificateurs 15 et 17 et détection synchrone 5. Le signal continu  $v'_{ph}$  amplifié est ensuite comparé à un signal de référence  $U$  à l'aide d'un amplificateur différentiel 18.  $U$  est ajusté à la valeur de  $V_{pi}$  qui donne au photopotentiel une valeur moitié du photopotentiel correspondant à la forte inversion 30 ( $V_{ph\_max}/2$ ). La différence de valeur résiduelle  $\Delta(v'_{ph}-U)$  de ces deux signaux est amplifiée par l'amplificateur différentiel 18 de gain  $G_2$  et la tension de sortie  $\Delta(v'_{ph}-U)$  est appliquée à la structure 1 en même temps que la polarisation continue  $V_p$  imposée par un générateur de tension 19 couplé à un sommateur 20. Un générateur de 35 signal basse fréquence 4.1. (BF) permet, après amplification à l'aide d'un amplificateur 2.1., de commander la diode 4 dont le faisceau excite la structure 1 et également de référencer la détection synchrone 5. Le microordinateur 6, qui est

notamment relié à un organe 22 d'acquisition de la variable  $\Delta(v'ph-U)$ , permet de suivre et d'enregistrer la variation de polarisation de la structure  $\Delta V_p$  occasionnée par la variation du potentiel de bandes plates ( $\Delta V_{bp}$ ).

L'intérêt d'un tel montage est que le potentiel électroniquement imposé est directement et linéairement l'image des variations du potentiel de bandes plates  $V_{bp}$ , provoquées par les interactions à la surface du diélectrique. Il est donc indépendant des propriétés de la structure et permet d'obtenir une bonne sensibilité et une excellente reproductibilité.

La cellule (capteur) est semblable à celle décrite supra en référence à la Figure 1.

La mesure du photopotentiel étant réalisée au moyen d'un circuit de mesure possédant une forte impédance d'entrée, il est possible d'admettre un contact ohmique de médiocre qualité. Pour mesurer le photopotentiel du semiconducteur par rapport à la solution, une électrode possédant un potentiel constant par rapport à la solution est nécessaire. Cependant, du fait de la forte impédance du circuit de mesure, il est possible d'utiliser une pseudo-électrode de référence constituée par un métal noble tel que le platine, par exemple. L'électrode peut être indépendante ou être réalisée par dépôt, sous forme d'une grille ou d'un anneau externe, sur la surface du diélectrique de façon à satisfaire à la miniaturisation du capteur.

L'éclairage de la structure peut être obtenu au moyen d'une diode laser ou d'une diode électroluminescente émettant dans le domaine de longueur d'onde du visible ou du très proche infra-rouge, entre 400 et 1000 nm avec une puissance lumineuse de l'ordre de 0,1  $\mu$ W à 100  $m/cm^2$ . Il est tout à fait technologiquement concevable d'envisager l'éclairage de la structure par la face arrière et même d'intégrer au capteur la partie génératrice de la lumière. Ces possibilités techniques permettraient de disposer d'un capteur de très faibles dimensions, dont seule la face avant serait au contact de la solution et qui serait ainsi, de part la nature des matériaux qui la composent, très peu sensible à l'agression chimique.

Il est tout à fait possible d'utiliser comme signal traceur  $I_{ph}$ . Dans ce cas, l'adaptateur d'impédance 14 est remplacé par un convertisseur courant/tension.

Les formes d'exécution du dispositif selon l'invention représentées aux Fig. 1 et 5 décrites supra sont dénommées arbitrairement GENOPTEL.

Conformément à une autre forme d'exécution du dispositif selon l'invention, correspondant au troisième mode de mise en oeuvre du procédé, ledit dispositif est caractérisé en ce que le capteur d'affinité comprend au moins une structure **Sc/Is-So** et au moins une structure de référence **Sc/Is** non fonctionnalisée par **So**, de manière à pouvoir réaliser une mesure différentielle.

Cette forme d'exécution que l'on appellera DIGENOPT est représentée à la Figure 6.

Elle correspond au cas où l'on a un capteur d'affinité 1 ou cellule de mesure comprenant avantageusement deux structures Sc/Is 31 et 32 quasi identiques, l'une étant fonctionnalisée par So, l'autre non. Ces deux structures (ou électrodes) sont mises en contact avec le même milieu 2 LC et sont polarisées au moyen d'une même contre-électrode 33. Une électrode de référence n'est pas nécessaire. Elles sont éclairées de manière identique par une lumière modulée fournie par une diode 4. L'acheminement de la lumière vers le milieu LC 2 se fait par l'intermédiaire d'un conducteur optique 34, ménagé au travers du corps 35 du capteur 1.

5 10 Les deux structures Sc/Is 31 et 32 (électrodes) sont montées chacune à la pointe d'un élément 36 vissable dans le corps 35 du capteur 1.

Le corps 35 comprend une cavité fermée latéralement par les électrodes 31 et 32, contenant le milieu LC - 2 -.

15 Des joints 37 sont prévus pour assurer l'étanchéité entre les différentes parois. La paroi du dessus reçoit les moyens d'éclairage 4 et 34. Le fond est traversé par la contre-électrode 33. Les périphériques électroniques adaptés permettent de suivre la différence de leur Vbp respectif =  $Vbp_1 - Vbp_0$ .

20 On terminera l'illustration non limitative du dispositif de l'invention, en décrivant une dernière forme d'exécution, mais non la moindre, qui est celle selon laquelle le dispositif est caractérisé en ce que le capteur d'affinité comprend au moins une structure Sc/Is-So, dans laquelle les sondes So sont de différentes natures, les sondes So de même nature étant regroupées dans une même zone de la couche d'Is, chaque zone étant circonscrite par rapport aux autres de manière à pouvoir être éclairée séparément partiellement ou en totalité par les moyens d'éclairage.

25 30 Cette forme d'exécution arbitrairement désignée par l'expression GENMAP, a été rendue possible en raison du fait que le principe de la mesure selon l'invention est telle que le photopotentiel et/ou le photocourant dépend du flux de lumière mais est pratiquement indépendant de l'aire de la surface éclairée. Il est donc ainsi envisageable de réaliser sur la même structure Sc/Is des régions différemment fonctionnalisées qui répondent de manière spécifique à différentes espèces cibles (e.g.  $PN_1$  à  $PN_n$ ), la lecture de l'appariement ou de l'hybridation étant effectué au moyen d'un faisceau lumineux par scrutin successive ou de manière simultanée par plusieurs faisceaux lumineux.

35 Une telle structure Sc/Is est assimilable à un multicapteur biologique donnant accès à la multidétection.

Les différentes zones de la surface de l'Is peuvent être délimitées ou non physiquement.

La lecture multizone par les moyens d'éclairement permet d'accéder au potentiel de bande plate local de chaque zone fonctionnalisée spécifiquement :

5 - soit par mesure de l'impédance optoélectrochimique selon le premier mode de mise en oeuvre - variante faible ou fort éclairement,

- soit par mesure de la valeur efficace de Vph-variante (i) du deuxième mode de mise en oeuvre,

10 - soit par prise en compte des variations de Vp permettant la régulation et le maintien de Vph à une valeur proche de sa valeur moyenne (variante ii du deuxième mode de mise en oeuvre).

En d'autres termes, l'acquisition de Vbp peut s'effectuer selon l'un quelconque des modes de mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

15 La Figure 7 annexée est un schéma de principe de la structure multicapteur Sc/Is- $So_1$  à  $So_n$ . On a repris les mêmes références que sur la Figure 1 pour désigner les moyens d'éclairement 4, les sondes  $So_1$  à  $So_n$  repérées par la référence 7.3, la couche Is 7.2. et la plaquette de semi-conducteur Sc référencée par 7.1. On retrouve également le contact ohmique 8.

## 20 APPLICATION INDUSTRIELLE :

25 Ce type de dispositif ouvre la voie des applications nombreuses et variées dans le domaine de la génétique : détection de maladies virales, et de maladies génétiques, vérification de la compatibilité cellulaire, réalisation de cartes de génomes, expression ou mutation de gènes etc.

L'intérêt de ce dispositif comparativement aux autres dispositifs utilisés pour la multidétection, réside dans sa simplicité de réalisation et dans la simplicité du mode de lecture associé à la reconnaissance directe du processus d'hybridation.

30 Selon un autre de ces aspects, l'invention concerne également les capteurs d'affinité, c'est-à-dire les structures Sc/Is- $So$  de mesure et Sc/Is de référence, telles que décrites supra.

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention et de faire ressortir tous ses avantages et ses variantes, tant sur le plan du procédé que sur celui du dispositif.

**EXEMPLES****EXEMPLE 1 : MESURE DES IMPEDANCES OPTOELECTROCHIMIQUES A L'AIDE DU DISPOSITIF DE L'INVENTION COMPRENANT UNE STRUCTURE Sc/Is ELEMENT DE BASE DU BIOCAPTEUR**5      **1.1. APPAREILLAGE**

Le dispositif mis en oeuvre dans cet exemple correspond à celui représenté à la Fig.1.

La structure Sc/Is comprend :

- un semiconducteur ayant une épaisseur de 0,03mm est du Silicium dopé p à hauteur d'environ  $10^{15}$  cm<sup>-3</sup>, avec en face arrière une couche Au/Cr assurant le contact ohmique.
- et un isolant Is est de la silice d'une épaisseur de 10 nm obtenue par oxydation thermique.

**1.2. MILIEU LIQUIDE LC : SOLUTION TAMPON TRIS 1M.**

15     Cette solution tampon de pH 7.1 est composée de 10 mM TrisHCl (Sigma) et 50 mM NaCl.

**1.3. LES CONDITIONS EXPERIMENTALES SONT LES SUIVANTES :**

la fréquence des modulations de la lumière est de 316 Hertz.

20     La source lumineuse est un laser hélium-néon émettant un éclairement de longueur d'onde  $\lambda = 632,8$  nm.

La puissance lumineuse est de 0,6  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>

**1.4. RESULTATS**

La figure 8 annexée montre les courbes d'impédances optoélectrochimiques  $Z_{op}$  et  $Z_{oq}$  en fonction de  $V_p$  obtenues pour la structure décrite précédemment.

Dans le domaine de polarisation négative, l'impédance en quadrature est due à la capacité de la zone de charge d'espace du semi-conducteur, celle-ci est directement liée au dopage du semiconducteur. Dans le domaine de polarisation positive, l'impédance en quadrature est très faible car le semi-conducteur est en situation d'accumulation et la capacité de la zone de charge d'espace est très élevée. Dans le domaine de polarisation intermédiaire, le semiconducteur passe successivement de la situation d'inversion, à la désertion, puis à l'accumulation, lorsque la polarisation augmente. L'impédance en phase présente un pic dans le domaine intermédiaire. Ce pic est dû à la présence d'états d'interface situés entre le semiconducteur et la couche d'oxyde. Ainsi, les impédances optoélectrochimiques donnent les informations énergétiques sur le semi-conducteur et sur les états de

surface du semiconducteur mais ne donne pas d'informations sur la couche diélectrique. Cependant, elles permettent de déterminer le potentiel de bandes plates du semiconducteur. La valeur du potentiel de bandes plates est corrélée à la position de la courbe d'impédance en quadrature par rapport à l'axe des potentiels. C'est le 5 paramètre qui permet de caractériser la charge de surface de la structure.

**EXEMPLE 2 : APPLICATION DES MESURES D'IMPEDANCES SELON L'EXEMPLE A LA DETECTION BIOLOGIQUE : PN = ADN (OLIGO dT) 1ER MODE DE MISE EN OEUVRE- VARIANTE FAIBLE ECLAIREMENT**

#### *2.1. LE DISPOSITIF*

10 Le dispositif utilisé, y compris la structure Sc/Is et le milieu conducteur LC, sont les mêmes qu'à l'exemple 1, à la différence près que la structure Sc/Is est fonctionnalisée par des sondes So constituées par des nucléotides PNc complémentaires à des espèces cibles PN contenues dans LC.

#### *2.2. FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DE L'ISOLANT IS PAR DES SONDES SO CONSTITUÉES PAR DES OLIGONUCLEOTIDES dT DE 20 BASES*

Après hydroxylation de la surface de Si/So<sub>2</sub>, on dépose une couche polymérique d'APTS (AminoPropylTriéthoxySilane). Les brins d'oligonucléotides (dT) sont greffés sur la surface par bromation : cette méthode permet de fixer à l'APTS le nucléotide sans utiliser les sites intervenant dans l'hybridation. Enfin 20 l'hybridation est obtenue après avoir laissé la structure au contact d'une solution contenant des brins complémentaires poly (dA) à ceux fixés sur la surface.

#### *2.3. RESULTATS*

La Figure 9 correspond aux courbes d'impédances obtenues à chaque étape d'élaboration d'une structure active fonctionnalisée pour la reconnaissance de 25 brins simples d'ADN.

Les courbes de la Figure 9 montrent le déplacement lié à l'hybridation des brins complémentaires PNc /PN d'ADN.

**EXEMPLE 3 : ANALYSE DE POLYNUCLEOTIDES (PN) A L'AIDE DU DISPOSITIF SELON L'INVENTION (FIG 1) - 1ER MODE DE MISE EN OEUVRE DU PROCEDE - VARIANTE 30 FORT ECLAIREMENT**

La Fig. 10 représente la courbe  $V_{ph} = f(V_p)$  GENOPTRODE

**EXEMPLE 4 : ANALYSE DE POLYNUCLEOTIDES (PN) A L'AIDE D'UNE VARIANTE DU DISPOSITIF SELON L'INVENTION (FIGURE 5), SELON LE DEUXIEME MODE DE MISE EN OEUVRE DU PROCEDE - VARIANTE (ii)**

**4.1. LE DISPOSITIF**

5 Le dispositif utilisé est celui décrit en Figure 5. La cellule de mesure et le capteur d'affinité sont ceux représentés sur la Figure 2. La lumière modulée est fournie au moyen d'une diode électroluminescente ; la puissance lumineuse utilisée est de 10 mW/cm<sup>2</sup>.

**4.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES ET FONCTIONNALISATION**

10 Le liquide conducteur **LC** est une solution aqueuse de 10 mM tris(hydromethyl)aminométhane hydrochloride (Sigma) et 50 mM NaCl ; l'ensemble de la solution est à pH 7.1. La mesure est faite à température ambiante, soit 22° C, dans l'obscurité.

15 La structure Sc/Is-So est telle que décrite dans les exemples précédents. Dans cet exemple, les sondes sont des PNC, et plus précisément des oligos dT de 20 bases, déposées sur la zone comme représenté en 7.3 de la figure 2 à partir d'une solution composée de 20 µl de solution aqueuse de n-bromosuccinimide en concentration de 0,01 M ajoutée à 1 ml de solution aqueuse 1M NaHCO<sub>3</sub> contenant des oligos (dT)<sub>20</sub> en concentration de 1mg/ml. La structure est laissée une nuit en 20 contact avec la solution des PNC, puis abondamment rincée avec le liquide **LC**, puis montée sur la cellule de mesure. Cette cellule est alors remplie de **LC** et la chaîne de mesure initialisée.

**4.3 RESULTATS**

25 La Figure 11 donne la réponse en  $\Delta V_p$  au cours du temps de la structure fonctionnalisée Sc/Is-So où les sondes sont des oligo dT.

La courbe A correspond à la réponse obtenue lorsque le capteur est en contact avec une solution **LC** à laquelle on a ajouté des cibles (polynucléotides dC en concentration de 1µg/ml) non complémentaire aux sondes fixées sur le capteur.

30 La courbe B correspond à la réponse obtenue lorsque le capteur est en contact avec une solution **LC** à laquelle on a ajouté des cibles (polynucléotides dA en concentration de 1 µg/ml) complémentaires aux sondes fixées sur le capteur.

**REVENDICATIONS :**

1 - Procédé d'identification et/ou de dosage de Substances Biologiques (SBC) présentes dans un milieu Liquide Conducteur LC, à l'aide d'au moins un capteur d'affinité comprenant au moins une structure comportant au moins un 5 matériau semi-conducteur Sc, revêtu sur au moins l'une de ses faces d'au moins une couche d'isolant Is, cette dernière présentant à sa surface au moins une sonde So, en contact avec le milieu conducteur LC et comprenant une ou plusieurs Substances Biologiques de Reconnaissance spécifique par interaction affine (SBR), des SBC du milieu LC sus-visé,

10 caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à :

- a - sélectionner à titre de sonde(s) So, des SBR non-marquées,
- b - faire en sorte que le niveau de Fermi du Sc corresponde sensiblement au, ou passe par le niveau intrinsèque en surface du Sc,
- c - soumettre le Sc à un éclairement périodique comprenant des photons dont l'énergie est  $\geq$  à l'énergie de la bande interdite du Sc,
- d - mesurer directement ou indirectement les variations  $\Delta V_{bp}$  du potentiel de bandes plates Vbp du Sc, induites par un phénomène d'effet de charges directement et essentiellement lié aux appariements spécifiques des SBC du milieu conducteur LC avec leurs ligands complémentaires SBR de la ou des sondes So, à l'exclusion :
- 25 (i) des variations résultant d'éventuels effets de charges et/ou de transferts de charges provoqués par des réactions chimiques catalysées par des enzymes et dans lesquelles se produit une consommation d'une partie des substances à détecter,
- (ii) et des variations de la photoréponse liées à l'apparition dans le milieu LC d'au moins un produit traceur susceptible d'être révélé au travers de variations de pH ou de potentiel Redox, et/ou au travers de marqueurs, de préférence du type de ceux 30 absorbant ou émettant des radiations (fluorescents, radioactifs, colorés, e.g.).
- e - et interpréter les signaux recueillis en termes d'identification et/ou de dosage des SBC du LC.

2 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les **SBC** sont des polynucléotides **PN** et en ce que les **SBR** sont des polynucléotides **PNC**.

3 - Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé

5      • en ce que, dans l'étape b, on polarise le **Sc** par rapport au **LC** en imposant une tension de polarisation **Vp** selon un balayage entre une tension négative et une tension positive limites, choisies de telle sorte que le niveau de Fermi du **Sc** passe par son niveau intrinsèque en surface, **Vp** évoluant ainsi avantageusement dans une gamme de tension correspondant au régime de désertion et de faible inversion du **Sc**,

10      • et en ce que, selon l'étape d, on mesure  $\Delta V_{bp}$  :

- en recueillant le photopotentiel **Vph** aux bornes du **Sc**, (entre **Sc** et **LC**) et/ou le photocourant **Iph**,
- en calculant éventuellement les impédances optoélectrochimiques en phase **Zop** et/ou en quadrature **Zoq**, pour chaque valeur de **Vp**,
- en établissant la (ou les) courbe(s) **Zop** et/ou **Zoq** et/ou **Vph** et/ou **Iph** en fonction de **Vp**,
- et en suivant le déplacement de cette (ou ces) courbe(s) parallèlement à l'axe des abscisses (potentiels **Vp**), ledit déplacement correspondant aux variations de **Vbp** recherchées.

20      4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on met en oeuvre un faible éclairement, sensiblement sinusoïdal.

25      5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on met en oeuvre un fort éclairement.

30      6 - Procédé selon les revendications 3 et 5, caractérisé en ce que, selon l'étape d, on appréhende les variations de **Vbp** :

- en recueillant **Vph** et/ou **Iph**,
- en établissant la courbe  $Vph = f(Vp)$  et/ou  $Iph = f(Vp)$  ;
- et en suivant le déplacement de cette (ces) courbe(s) parallèlement à l'axe des abscisses (potentiels **Vp**), ledit déplacement correspond aux  $\Delta V_{bp}$  recherchées.

35      7 - Procédé selon la revendication 1 et la revendication 3, caractérisé

- en ce que, dans l'étape b, on fixe le niveau de Fermi du (**Sc**) sensiblement au niveau intrinsèque en surface du (**Sc**), en imposant une tension de polarisation **Vpi** correspondant environ, à l'abscisse du point d'inflexion de la courbe  $Vph = f(Vp)$ , ou  $Zoq = f(Vp)$   $Iph = f(Vp)$  ; **Vph**, **Zoq** et **Iph** étant tels que défini

dans la revendication 3, de telle sorte que l'ordonnée de ce point d'inflexion corresponde à environ  $V_{ph}$  max/2,  $Z_{oq}$  max/1 ou  $I_{ph}$  max/2,

- et en ce que, selon l'étape d, on appréhende les variations de  $V_{bp}$  :
  - (i) par la mesure de l'évolution de  $V_{ph}$  et/ou  $I_{ph}$  et/ou  $Z_{oq}$ ,
  - (ii) et/ou par la prise en compte des variations de la tension de polarisation  $\Delta V_p$ , rendues nécessaires pour maintenir constant  $V_{ph}$  max/2,  $Z_{oq}$  max/2, ou  $I_{ph}$  max/2, cet ajustement  $\Delta V_p$  étant le reflet de  $\Delta V_{bp}$ .

8 - Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que, pour la prise

10 en compte (ii) de  $\Delta V_p$  ;

- on détecte  $v_{ph}$ ,
- on amplifie éventuellement le signal  $v_{ph}$ ,
- on redresse éventuellement ce signal de manière à disposer d'un signal continu  $v'_{ph}$ ,
- on compare ce signal  $v'_{ph}$  continu à un signal de référence  $U$  correspondant sensiblement à la valeur de  $v'_{ph}$  max/2 (ordonnée de point d'inflexion de la courbe  $v'_{ph} = F(V_p)$ , soit  $v'_{ph}$  max/2),
- on recueille la différence  $\Delta(V'_{ph}-U)$  entre  $V'_{ph}$  et  $U$ ,
- on amplifie éventuellement  $\Delta(V'_{ph}-U)$ ,
- on applique  $\Delta(V'_{ph}-U)$  éventuellement amplifiée entre  $Sc$  et  $LC$  en complément de  $V_p$ ,
- on enregistre  $\Delta(V'_{ph}-U)$ .

9 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé

en ce que, pour l'étape c, on choisit la longueur d'onde de l'éclairement  $\lambda$  de telle

25 sorte qu'elle soit supérieure ou égale à  $\lambda_0 = \frac{1240}{E(\text{énergie bande interdite})}$  nm, de

préférence comprise entre 100 et 3000 nm.

10 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé

en ce que l'on met en oeuvre une mesure différentielle, en faisant intervenir dans le capteur d'affinité au moins une autre structure  $Sc/Is$  de référence, dans laquelle  $Is$

30 n'est pas fonctionnalisé par  $So$ , et en suivant la différence entre les  $V_{bp}$  mesurées par les 2 capteurs, ainsi que la variation de cette différence.

11 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 10, caractérisé

en ce que, (dans une étape préalable  $a_0$ ), on fonctionnalise la surface d'une couche d'isolant  $Is$  d'une même structure  $Sc/Is$ , par plusieurs sondes  $So$  différentes de par la

35 nature des  $PNc$  qui les composent, et on réalise ensuite à l'aide de cette structure l'analyse de  $LC$  contenant différents substrats  $PN$  :

- par éclairements successifs des zones de la surface de l'Is, lesdites zones étant chacune fonctionnalisée par une même So (PNc identiques), la nature des So variant d'une zone à l'autre,
- et par recueil et interprétation des  $\Delta V_{bp}$ .

5 **12** - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 11, caractérisé en ce que les substrats à analyser PN sont choisis dans la liste suivante : nucléotides, oligonucléotides, polynucléotides, acides nucléiques (ADN/ARN) et leurs mélanges.

10 **13** - Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 10 - au moins un capteur d'affinité formé par au moins une structure Sc/Is-So dans laquelle la ou les sondes So comprennent des ligands SBR aptes à s'hybrider spécifiquement avec les substances biologiques SBC à analyser, contenues dans le milieu liquide conducteur LC, en provoquant un phénomène d'effet de charge, à l'origine des  $\Delta V_{bp}$  du Sc,
- des moyens de polarisation du Sc par rapport au LC,
- des moyens d'éclairement du Sc du capteur,
- des moyens de mesure du photopotentiel  $V_{ph}$  ou du photocourant  $I_{ph}$ ,
- 15 - des moyens de transformation des signaux recueillis en variation de  $V_{bp}$ ,
- et des moyens de calcul et d'interprétation des  $\Delta V_{bp}$  en termes d'identification et/ou de dosage des substances biologiques SBC.

20 **14** - Dispositif selon la revendication 13 caractérisé

25 en ce que la structure Sc/Is-So de son capteur d'affinité est formée par au moins une plaque de Sc de préférence en silicium, recouverte sur l'une de ses faces d'une couche Is d'isolant de préférence en silice, à la surface de laquelle sont fixées des sondes So sensibles comprenant des polynucléotides PNc de reconnaissance spécifique par hybridation,

30 ce capteur comportant également au moins un contact ohmique permettant la connexion de la structure Sc/Is-So, notamment, avec les moyens de polarisation et/ou les moyens de mesure de  $V_{ph}$  ou  $I_{ph}$ ,

- et en ce qu'il comporte également au moins une électrode auxiliaire, éventuellement prévue sur la couche Is de la structure Sc/Is-So.

35 **15** - Dispositif selon la revendication 13 ou 14 caractérisé en ce qu'il comprend des moyens d'évaluation de la variation du signal  $V_{ph}$  par rapport à une

référence U, ainsi que des moyens de correction de cette variation par action sur les moyens de polarisation.

16 - Dispositif selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que le capteur d'affinité comprend au moins une structure Sc/Is-So et au moins une structure de référence non fonctionnalisée par So, de manière à pouvoir réaliser une mesure différentielle.

17 - Dispositif selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que le capteur d'affinité comprend au moins une structure Sc/Is-So dans laquelle les sondes (So) sont de différentes natures, les sondes So de même nature étant regroupées dans une même zone sur la couche d'Is, chaque zone pouvant être éclairée séparément et/ou successivement par les moyens d'éclairage.

18 - Capteur d'affinité tel que défini dans l'une quelconque des revendications 13, 14, 16 et 17.

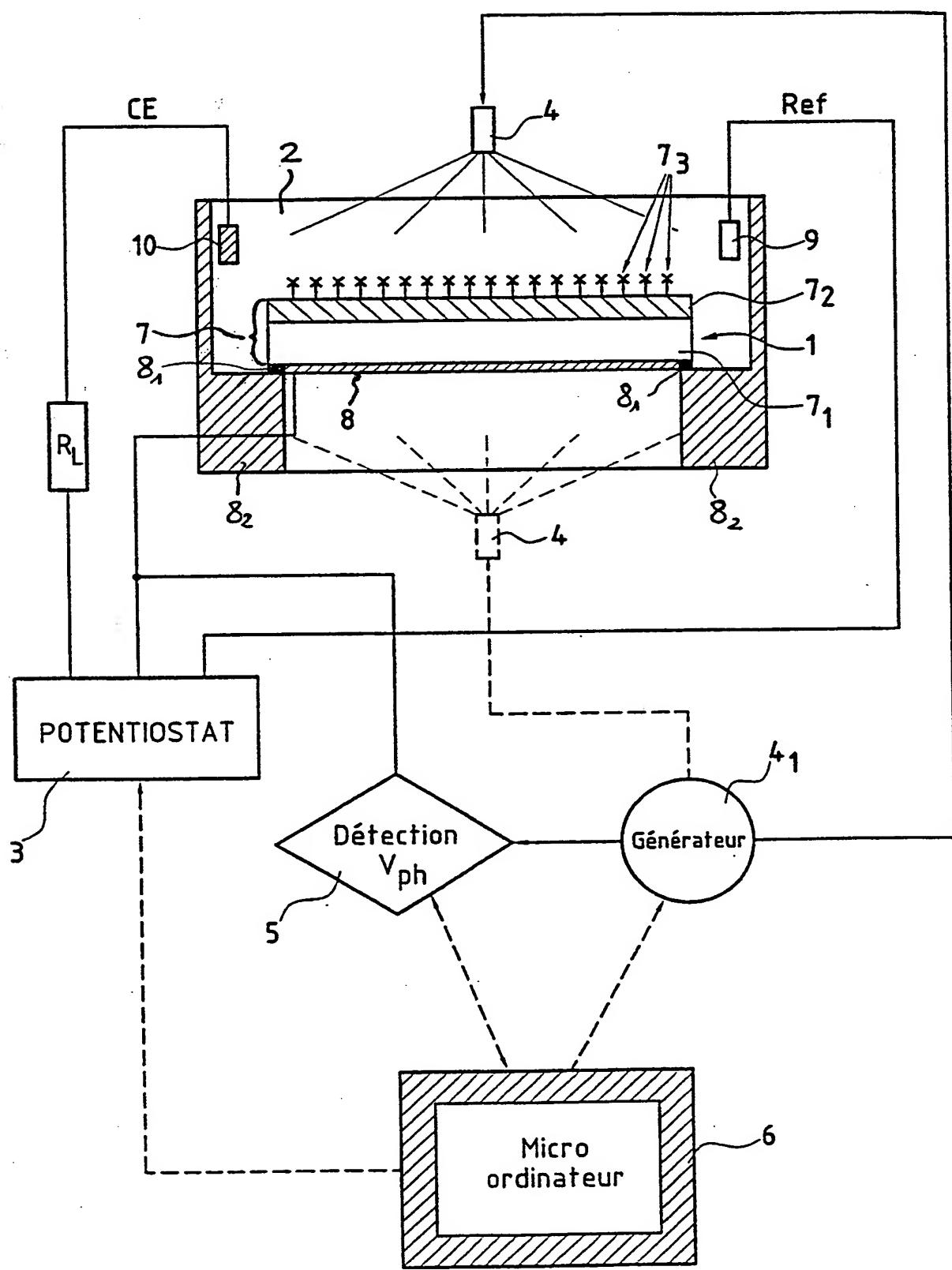


FIG.1

2/7

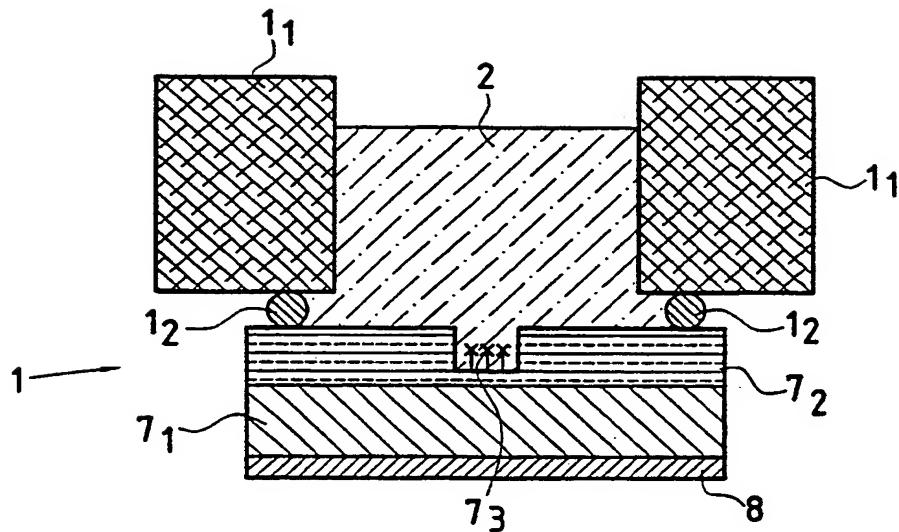


FIG.2

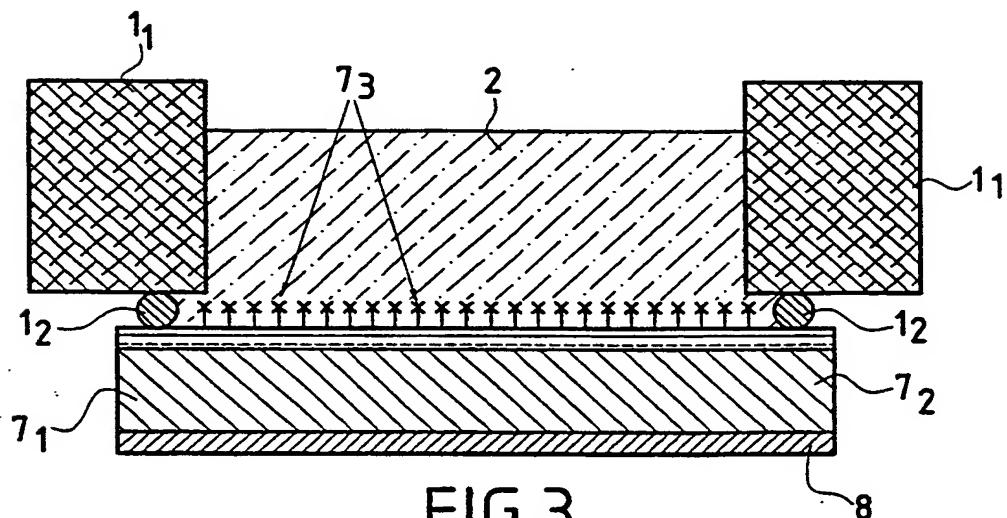


FIG.3

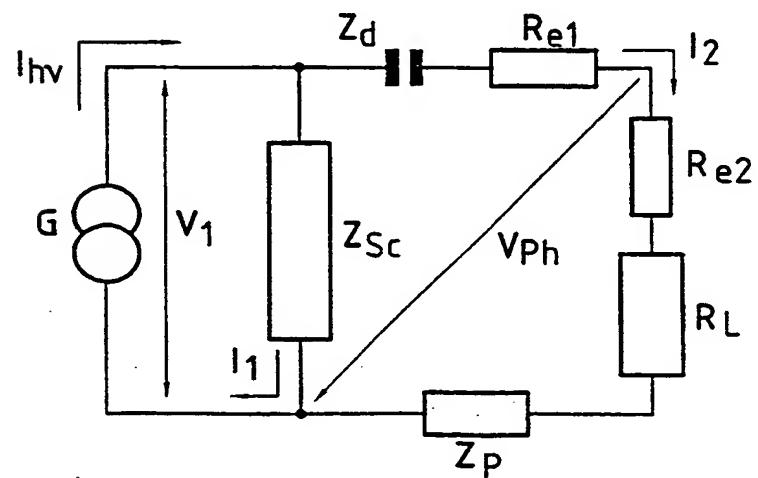


FIG.4

3/7

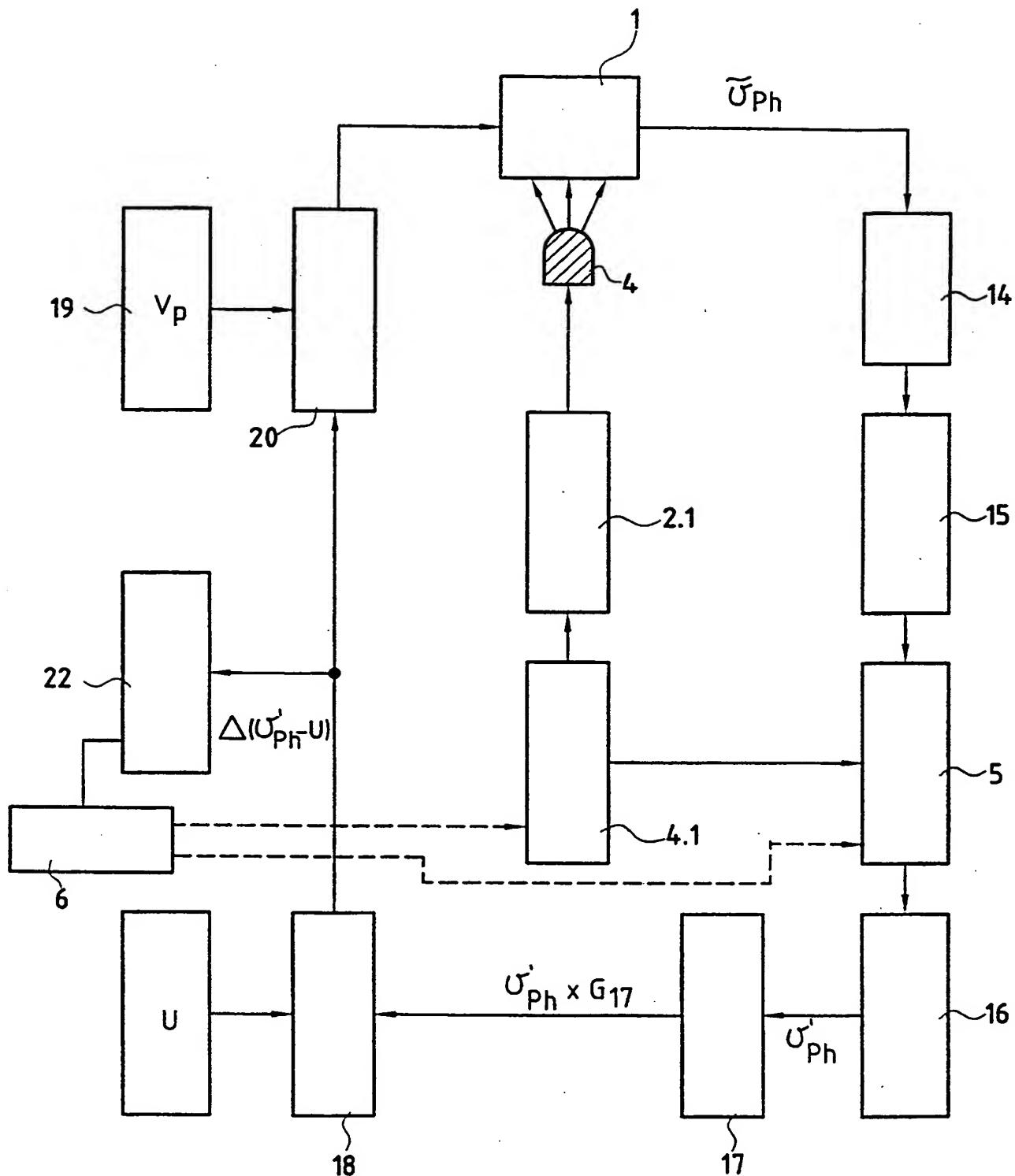


FIG.5

4/7

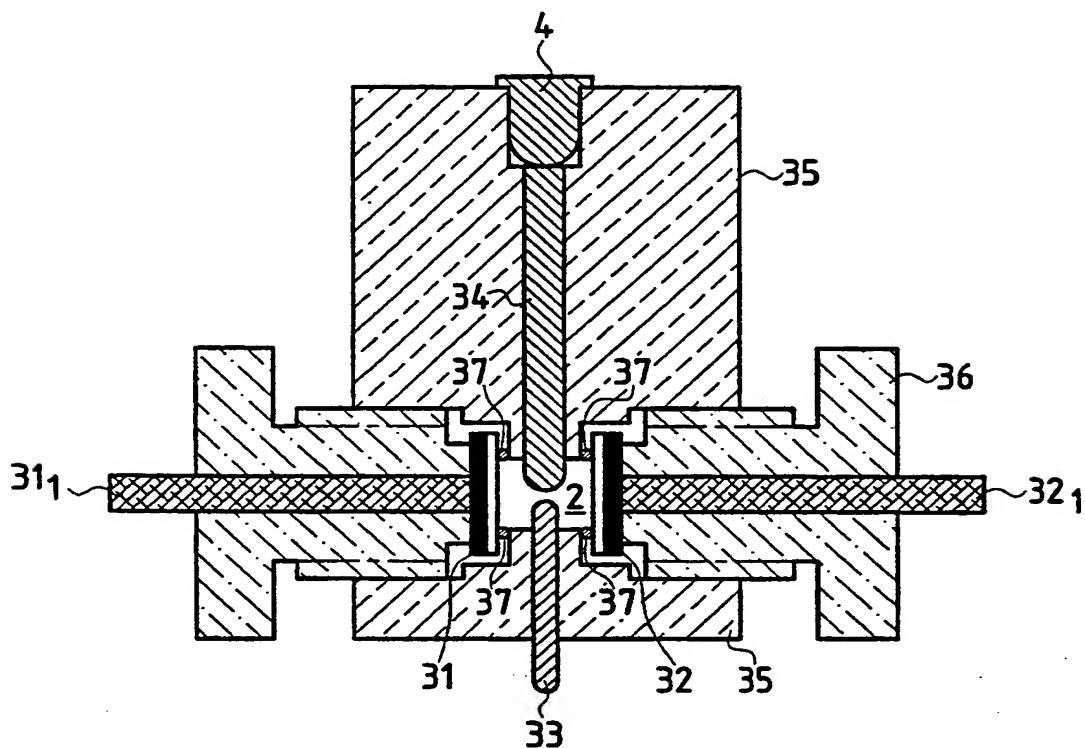


FIG.6

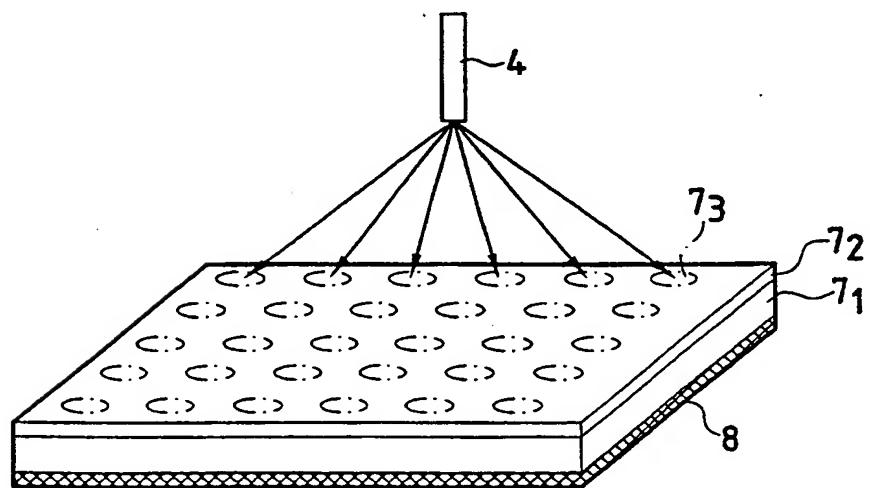
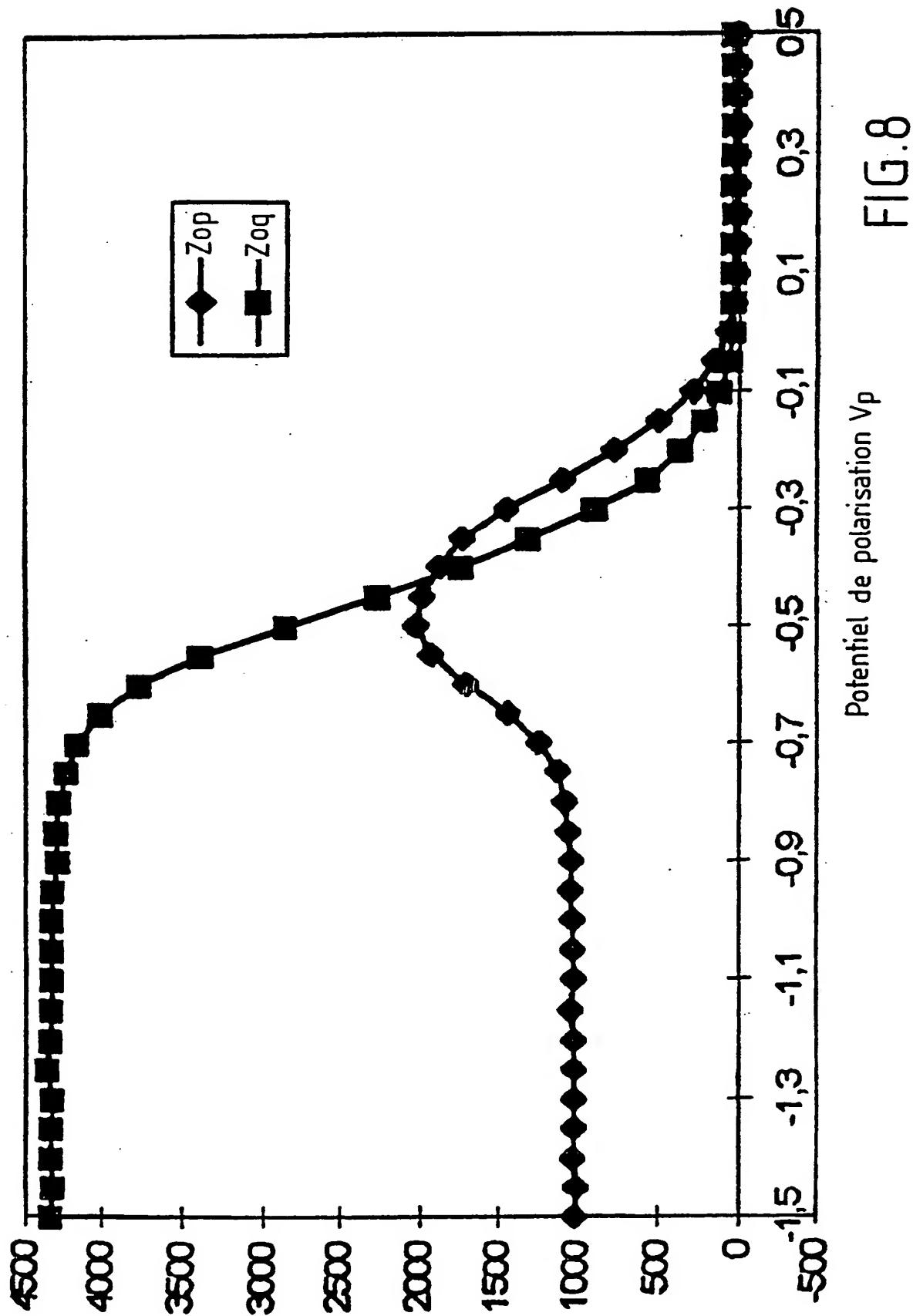


FIG.7

5/7

FIG. 8  
Potentiel de polarisation  $V_p$

6/7

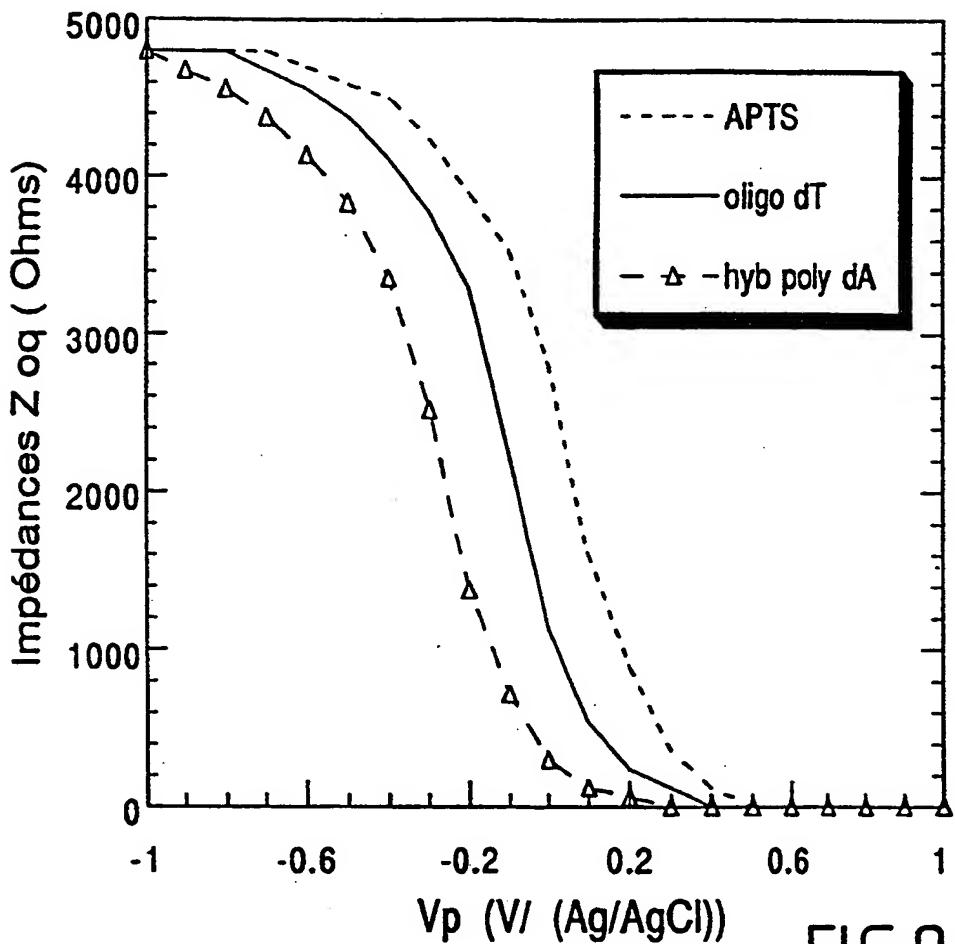


FIG.9

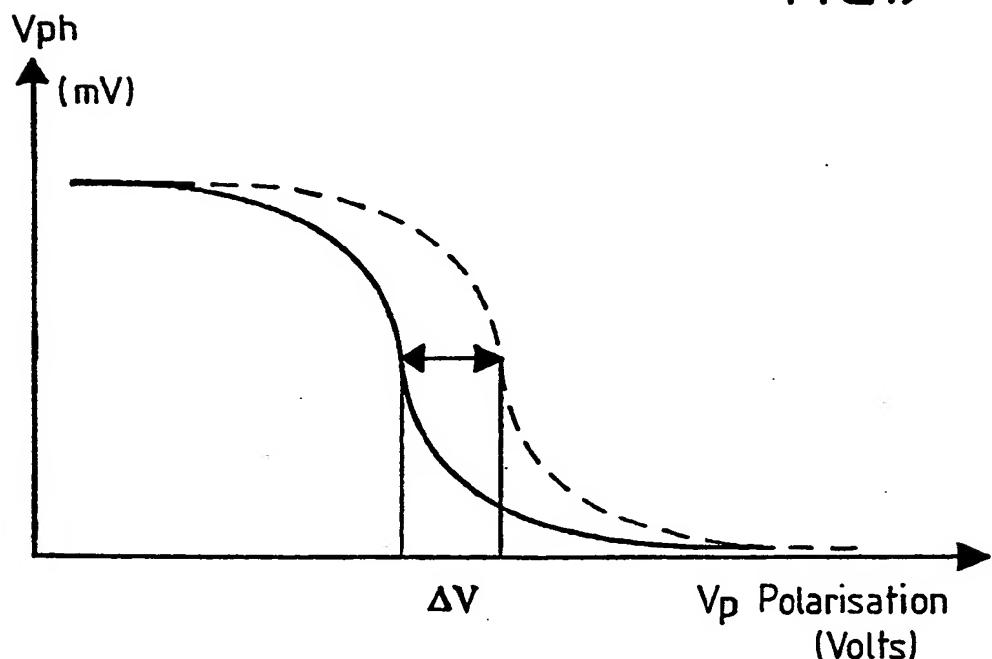


FIG.10

7/7

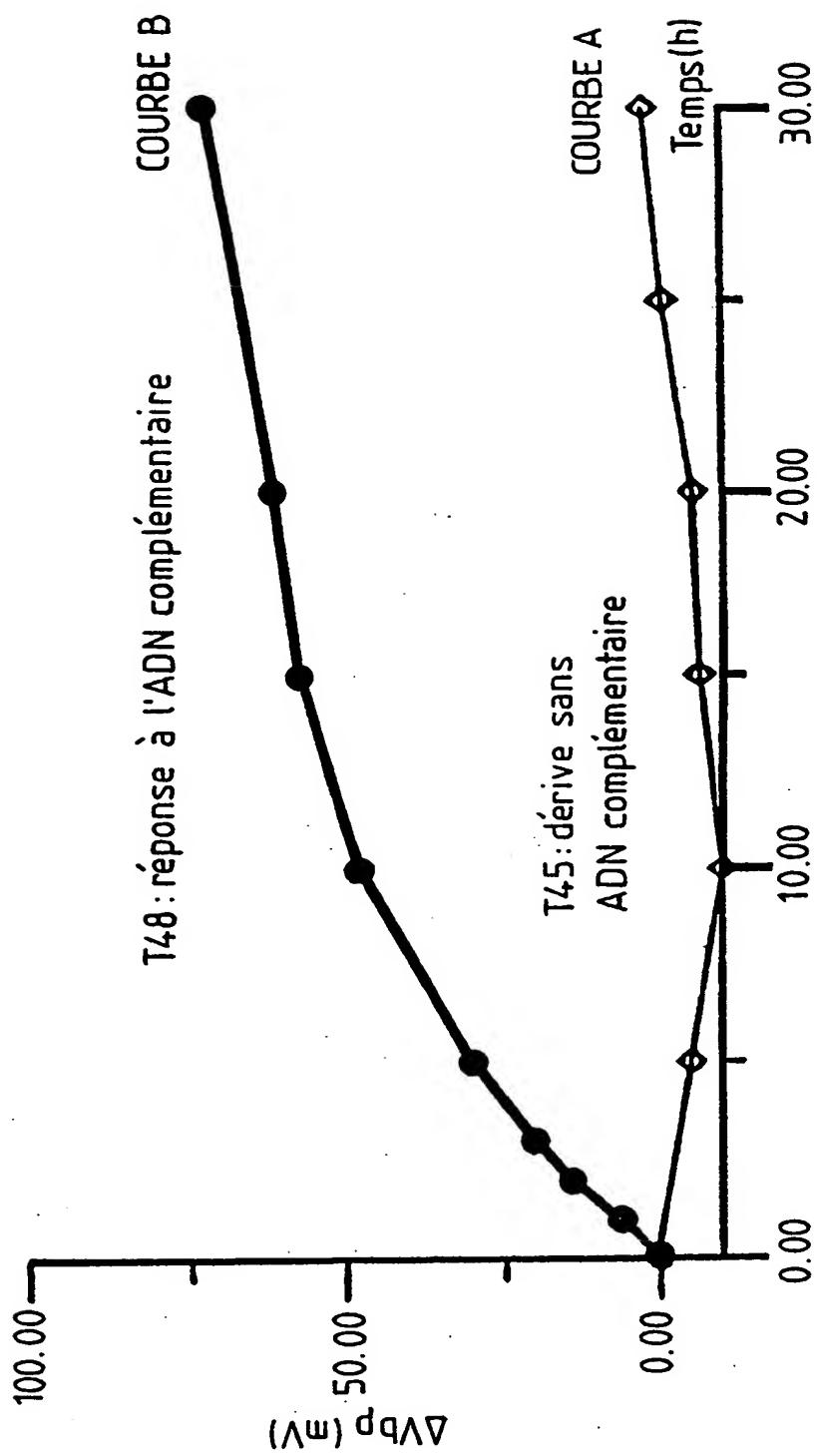


FIG.11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat...nal Application No

PCT/FR 98/01213

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 G01N27/30 G01N27/416

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 567 302 A (SONG HERKING ET AL) 22 October 1996 see column 6, line 62 - column 8, line 48; claims 8,17; figure 1	1
X	---	13,14
X	MOTOI NAKAO ET AL: "SCANNING-LASER-BEAM SEMICONDUCTOR PH-IMAGING SENSOR" SENSORS AND ACTUATORS B, vol. B20, no. 2/03, 1 June 1994, pages 119-123, XP000478150 LAUSANNE, CH see figure 2	13
	---	-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 October 1998

Date of mailing of the international search report

12/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brison, O

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. Application No

PCT/FR 98/01213

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Y. SASAKI ET AL.: "HIGHLY SENSITIVE TASTE SENSOR WITH A NEW DIFFERENTIAL LAPS METHOD" SENSORS AND ACTUATORS B, vol. B25, no. 1/03, PART 02, 1 April 1995, pages 819-822, XP000532861 LAUSANNE, CH see figure 1 ---	13,14,16
X	INOUE S ET AL: "CHEMICAL-IMAGING SENSOR USING ENZYME" SENSORS AND ACTUATORS B, vol. B32, no. 1, April 1996, pages 23-26, XP000636382 LAUSANNE, CH see figures 1,3 ---	13,14,17
A	EP 0 750 195 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 27 December 1996 see the whole document ---	13
A	WO 85 04018 A (MOLECULAR DEVICES CORP) 12 September 1985 see the whole document & US 5 500 188 A cited in the application ---	1,13
A	FR 2 722 294 A (LYON ECOLE CENTRALE) 12 January 1996 cited in the application see the whole document -----	1,13,18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...formation on patent family members

Internat...al Application No

PCT/FR 98/01213

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5567302	A 22-10-1996	NONE		
EP 0750195	A 27-12-1996	JP 9005289 A		10-01-1997
		CA 2179459 A		21-12-1996
		CN 1156825 A		13-08-1997
WO 8504018	A 12-09-1985	US 4591550 A		27-05-1986
		AU 624621 B		18-06-1992
		AU 3780789 A		19-10-1989
		AU 4063285 A		24-09-1985
		CA 1269705 A		29-05-1990
		CA 1301250 A		19-05-1992
		DK 503985 A		01-11-1985
		EP 0172892 A		05-03-1986
		JP 7109414 B		22-11-1995
		JP 61501723 T		14-08-1986
		US 5500188 A		19-03-1996
		US 4968148 A		06-11-1990
		US 5112134 A		12-05-1992
FR 2722294	A 12-01-1996	NONE		

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 98/01213

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 G01N27/30 G01N27/416

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 567 302 A (SONG HERKING ET AL) 22 octobre 1996 voir colonne 6, ligne 62 - colonne 8, ligne 48; revendications 8,17; figure 1 ---	1
X	MOTOI NAKAO ET AL: "SCANNING-LASER-BEAM SEMICONDUCTOR PH-IMAGING SENSOR" SENSORS AND ACTUATORS B, vol. B20, no. 2/03, 1 juin 1994, pages 119-123, XP000478150 LAUSANNE, CH voir figure 2 --- -/-	13,14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### ° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 octobre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/10/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Brison, O

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 98/01213

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>Y. SASAKI ET AL.: "HIGHLY SENSITIVE TASTE SENSOR WITH A NEW DIFFERENTIAL LAPS METHOD"            SENSORS AND ACTUATORS B,            vol. B25, no. 1/03, PART 02, 1 avril 1995,            pages 819-822, XP000532861            LAUSANNE, CH            voir figure 1</p> <p>---</p>	13,14,16
X	<p>INOUE S ET AL: "CHEMICAL-IMAGING SENSOR USING ENZYME"            SENSORS AND ACTUATORS B,            vol. B32, no. 1, avril 1996, pages 23-26,            XP000636382            LAUSANNE, CH            voir figures 1,3</p> <p>---</p>	13,14,17
A	<p>EP 0 750 195 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 27 décembre 1996            voir le document en entier</p> <p>---</p>	13
A	<p>WO 85 04018 A (MOLECULAR DEVICES CORP)            12 septembre 1985            voir le document en entier            &amp; US 5 500 188 A            cité dans la demande</p> <p>---</p>	1,13
A	<p>FR 2 722 294 A (LYON ECOLE CENTRALE)            12 janvier 1996            cité dans la demande            voir le document en entier</p> <p>---</p>	1,13,18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 98/01213

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
US 5567302	A	22-10-1996	AUCUN		
EP 0750195	A	27-12-1996	JP	9005289 A	10-01-1997
			CA	2179459 A	21-12-1996
			CN	1156825 A	13-08-1997
WO 8504018	A	12-09-1985	US	4591550 A	27-05-1986
			AU	624621 B	18-06-1992
			AU	3780789 A	19-10-1989
			AU	4063285 A	24-09-1985
			CA	1269705 A	29-05-1990
			CA	1301250 A	19-05-1992
			DK	503985 A	01-11-1985
			EP	0172892 A	05-03-1986
			JP	7109414 B	22-11-1995
			JP	61501723 T	14-08-1986
			US	5500188 A	19-03-1996
			US	4968148 A	06-11-1990
			US	5112134 A	12-05-1992
FR 2722294	A	12-01-1996	AUCUN		

